

PONIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DED CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENACIAS BIOLÓGICAS

Descripción de la oogénesis en siete especies de cecílicos de Ecuador

**Disertación previa a la obtención del Título de Licenciada en Ciencias
Biológicas**

Francesca Nicole Angiolani Larrea

2016

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Francesca Nicole Angiolani Larrea ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Pérez

Director de Disertación

Fecha

Con amor y gratitud,
Para mi familia, para Oscar, y para mí misma,
por entender lo que esto significa

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al museo QCAZ de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, al Doctor Santiago Ron y Fernando Ayala, al Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales, al Magister Mario Yáñez, a la Estación Biológica y Centro de Estudios Creativos Yanayacu, a José Simbaña, a Alejandro Arteaga, al laboratorio de citogenética de la PUCE, a la Magister Miryan Rivera, al laboratorio de histología del área de patología del Hospital Oncológico Solca y a la PUCE por el financiamiento de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1.RESUMEN	1
2.ABSTRACT	2
3.INTRODUCCIÓN	3
4.MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES	8
4.2. TABLA DE OOGÉNESIS	8
4.3. ANÁLISIS DE LA OOGÉNESIS	9
5.RESULTADOS	11
5.1. <i>Caecilia abitaguae</i>	13
5.2. <i>Caecilia tentaculata</i>	13
5.3. <i>Caecilia guntheri</i>	14
5.4. <i>Caecilia orientalis</i>	14
5.5. <i>Caecilia pachynema</i>	14
5.6. <i>Caecilia nigricans</i>	1
5.7. <i>Caecilia leucocephala</i>	13
6.DISCUSIÓN	17
7.LITERAURA CITADA	27
8.FIGURAS	33
9.TABLAS	53
10.ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estadios en la oogénesis de cecílicos

Figura 2: Estadios en la oogénesis en *C. abitaguae*

Figura 3: Estadios en la oogénesis en *C. tentaculata*

Figura 4: Estadios en la oogénesis en *C. guntheri*

Figura 5: Estadios en la oogénesis en *C. orientalis*

Figura 6: Estadios en la oogénesis en *C. pachynema*

Figura 7: Estadios en la oogénesis en *C. nigricans*

Figura 8: Estadios en la oogénesis en *C. leucocephala*

Figura 9: Características expresadas en los folículos, por tamaño

Figura 10: Diferencias en porcentaje del tamaño de cada estadio de la oogénesis

Figura 11: Orden filogenético de cecílicos cuya oogénesis es conocida

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Valores máximos y mínimos de oocitos por especie

Tabla 2: Medias de oocitos y núcleos por especie, por estadio

Tabla 3: Tamaño de estadios por especie

Tabla 4: Tamaño de oocitos de especies previamente descritas

1. RESUMEN

En el orden Gymnophiona la oogénesis ha sido descrita para nueve especies; de estas, sólo una está presente en el Ecuador y ninguna pertenece al género *Caecilia*, el más especioso del orden. Para este estudio, se realizaron cortes histológicos y tinción de eosina-hematoxilina en ovarios extraídos de especímenes de museo, así como también de animales vivos. Los tejidos fueron analizados por medio de micrografías y se compararon las características con estudios previos. Se determinaron cinco estadios en la oogénesis para las siete especies estudiadas, considerando características del folículo como el tamaño, morfología y las membranas que lo rodean. Las especies reflejan diferentes tamaños máximos de oocitos y diferencias en las propiedades celulares de los folículos. Se encontró modularidad y heterocronía en la oogénesis en comparación con las especies previamente descritas.

Palabras Clave: Oocito, Oogénesis, Heterocronía, Previtelogénico, Vitelogénico

2. ABSTRACT

Oogenesis has been previously described for nine species of Gymnophiona, one of which is present in Ecuador, and none of them belongs to the genus *Caecilia*, the most specious in the order. Histological sectioning was made, from ovaries obtained from museum and live specimens, and were stained with eosin-hematoxin dye. The tissue was analyzed by micrographies and compared to previous studies. Five oogenesis stages were determined for the seven species studied, considering follicular features as size, morphology and the membranes surrounding the oocyte. Species reflect different maximum oocyte sizes and differences on follicular properties. Modularity and heterochrony was found in oogenesis compared to previously described species.

Key Words: Oocyte, Oogenesis, Heterochrony, Previtellogenic, Vitellogenic.

3. INTRODUCCIÓN

El sistema reproductivo femenino en cecílidos está conformado por un par de ovarios alargados, paralelos a los riñones y al tracto digestivo. Inician en la mitad del cuerpo, longitudinalmente, y terminan en la cloaca. Por un lado, se unen a los riñones y por el otro lado a los cuerpos grasos, a través de una membrana conectiva llamada mesovario (revisado por Exbrayat, 2006). Dentro de cada ovario se encuentran los oocitos en diferentes estadios de desarrollo. El oviducto puede ser especializado dependiendo de la estrategia reproductiva, que en el caso de los cecílidos, puede ser bifásica (con estadio larval), de desarrollo directo o vivípara y (Laurin, *et al.*, 2000; Müller y Natuurwetenschappen, 2007; San Mauro, *et al.*, 2014).

El proceso de crecimiento de los oocitos ocurre antes de la maduración, entre dos arrestos, donde se dividen en los diferentes estadios (Wolpert y Tickle, 2011; Gilbert, 2014). Los oocitos presentan, después de cierto momento en el desarrollo capas celularizadas que los rodean, y al oocito junto con estas capas se lo conoce como folículo; a partir de esta definición se habla también de la foliculogénesis como proceso dentro de la oogénesis (Beyo, *et al.*, 2008b). Dentro de los anfibios, *Xenopus laevis* es la especie más estudiada por ser el modelo de desarrollo, y de la tabla de oogénesis de este, se obtienen el resto de descripciones. Para salamandras, la clasificación es concordante con lo descrito para *Xenopus*. En *Salamandra salamandra* *infraimmaculata*, por ejemplo, Sharon y colaboradores (1997) realizaron un estudio descriptivo de los ovarios y dividieron a la oogénesis en seis estadios. Los tres estadios iniciales son pre-vitelogénicos y los tres finales son post-vitelogénicos. En el estadio I, los oogonios se dividen para formar nidos celulares. En el estadio II, los oogonios se diferencian en oocitos. En el estadio III el citoplasma aumenta su volumen. En el estadio IV, los lípidos comienzan a aparecer acumulados en vacuolas

y, posteriormente, aparecen las plaquetas de yema cercanas al margen celular. El estadio V en el que el oocito alcanza su tamaño máximo, y el estadio VI donde el oocito ya está maduro.

La oogénesis en los cecílidos ha sido descrita en *Boulegerula boulengeri* (Serclerat, *et al.*, 2011), *Boulengerula taitana* (Raquet, *et al.*, 2015), *Ichthyophis beddomei* (Masood-Parveez y Nadkarni, 1993a, b), *Gegeneophis ramaswamii* (Beyo, *et al.*, 2007 a, b; Beyo, *et al.*, 2008 a, b; Beyo, *et al.*, 2010), *Chthonerpeton indistinctum* (Berois y De Sa, 1988), *Typhlonectes compressicauda* (Exbrayat, 2006), *Ichthyophis tricolor* (Beyo, *et al.*, 2007 a, b; Beyo, *et al.*, 2008 a, b; Beyo, *et al.*, 2010), *Ichthyophis supachaii* (Pewhom, *et al.*, 2015) y *Siphonops annulatus* (Gomes, 2010); siendo esta, la única especie presente en Ecuador de la cual se reporta la oogénesis. Hay una ardua discusión sobre la definición de los estadios de los oocitos en gymnophiona, sobre todo entre Exbrayat (2006) y Beyo *et al.* (2007 a, b). Exbrayat utiliza una categorización propia donde se consideran solo los estudios de oogénesis en cecílidos realizados hasta ese momento, mientras que Beyo *et al.* unifican sus estudios con las tablas de oogénesis del resto de anfibios, basadas en la tabla original para *X. laevis* de Dumont (1972) que clasifica a los oocitos de *Xenopus* en 6 estadios: (1) oocitos de 50-300µm y transparentes, (2) Oocitos blancos opacos de 300 a 450 µm, (3) Oocitos de 450 a 600 µm de color café claro, (4) Oocitos con diferenciación por pigmentación entre el polo animal y el vegetal de 600 a 1000 µm, (5) Oocitos de 1000 a 1200 µm con ambos hemisferios claramente definidos y (6) Oocitos con banda ecuatorial no pigmentada, de 1200 a 1300 µm. Todos estos estadios tienen mayor detalle citológico, el autor enumera las características de membrana vitelogénica, células foliculares, microvellosidades del oocito, gránulos corticales y cromosomas.

Exbrayat (2006) clasifica a los oocitos en seis estadios: (1) oogonios agregados en nidos germinales (2) oocitos primarios jóvenes, que pueden o no estar rodeados de células foliculares y pueden o no estar en nidos germinales (3) oocitos previtelogénicos, donde las células y sus núcleos son redondeados. Con uno o varios nucléolos, cromatina granular (4) Oocitos y folículos vitelogénicos, con plaquetas de yema grandes. El núcleo está presionado hacia el córtex. Gránulos corticales y zona pelúcida conspicua (5) Folículos atrésicos (con subdivisiones) (6) Oocitos con cuerpos lúteos. Beyo *et al.* utilizan las referencias de Dumont (1972) y de estudios posteriores de otros organismos también basados en Dumont; pero no proponen una clasificación propia para los cecílidos. Gomes (2010) por otro lado, utiliza una caracterización más sencilla donde no nombra estadios, sino que nombra a cada elemento. Dentro de los nidos germinales se encuentran células pre-granulosas y oogonios con núcleos grandes. Los oocitos I, que son los previtelogénicos, poseen un citoplasma basófilo, núcleo grande y están envueltos por una capa delgada de células foliculares. Los oocitos II son considerados como una fase vitelogénica inicial, están rodeados por una capa folicular donde se diferencian las células granulares y las de la teca. Hay un estadio más avanzado (III) en el que se observa mayor producción de vitelogenina, la teca es más gruesa, el núcleo es central e irregular y se observa una zona pelúcida. Finalmente, Gomes (2010) reporta folículos atrésicos con teca reducida y altamente vacuolizados. Finalmente, Pewhom *et al.* (2015) designa seis estadios: (1) Oogonios, (2) Oocitos Primarios, (3) Oocitos previtelogénicos tempranos, (4) Oocitos previtelogénicos tardíos, (5) Oocitos vitelogénicos tempranos y (6) Oocitos vitelogénicos tardíos.

Todos los autores coinciden en que los núcleos, desde los estadios previtelogénicos, poseen de uno a varios nucleolos. Este número aumenta conforme avanzan los

estadios. También coinciden en que el núcleo es excéntrico a partir de los estadios previtelogénicos y finalmente es presionado hacia la pared del folículo.

El reconocimiento de la morfología de los oocitos juega un rol importante en la localización de ARNm debido a que, al momento en que los genes maternos se localizan, como fue descrito anteriormente, en los estadios tempranos (I, II), los ARNs son desplazados a través de la nube mitocondrial. Por ejemplo, *vegT* es localizado por la vía tardía, en el estadio III (Kloc y Etkin, 2005; Sidova, *et al.*, 2015).

En el clado de los anfibios, se ha determinado que Gymnophiona es el grupo más basal (Pyron y Weins, 2011). De la misma forma, es el más enigmático debido al bajo número de estudios realizados en ellos. Esto, se debe a los hábitos fosoriales, característicos del orden y la dificultad de recolección y cuidado en cautiverio (Wright y Whitaker, 2001; Exbrayat, 2006). Actualmente se conocen 205 especies a nivel mundial (AmphibiaWeb, 2016), de las cuales 23 se encuentran en Ecuador, distribuidas en 4 familias. La información disponible para este orden es limitada a unas pocas de estas especies. A pesar de esto, se tiene una idea clara de las características adultas más importantes del grupo, como son la constitución craneal, los órganos sensoriales y la dentición. Otra característica importante para el grupo es la forma de fertilización respecto al resto de anfibios. La fertilización se produce por medio de una porción especializada y reversible de la cloaca llamada *fallodeum*. A través del *fallodeum* los machos depositan el esperma dentro de la cloaca de las hembras. De lo que se conoce, todas las especies del orden lo hacen (Wake, 1977; Kupfer, *et al.*, 2004; Exbrayat, 2006; Müller y Natuurwetenschappen, 2007). Además, los Gymnophiona tienen ciclos reproductivos largos (Wake 1977; Kupfer, *et al.*, 2004; Exbrayat, 2006). Como es conocido, los anfibios tienen una diversidad de especializaciones reproductivas muy amplias (Duellman y Trueb, 1994; Gomez-

Mestre, *et al.*, 2012). Dentro de las estrategias reproductivas se pueden enumerar en cecílidos están las especies bifásicas, que poseen un estadio larval intermedio entre el huevo depositado en un sustrato y el adulto, los desarrolladores directos, sin estadio larval, y finalmente los vivíparos (San Mauro *et al.*, 2014). Existen otros atributos especiales referentes al cuidado parental, como lo es el caso que describen Kupfer y colaboradores (2006) sobre la dermatofagia materna, en el cual, los recién nacidos de *Boulengerula taitanus* se alimentan de secreciones dérmicas de ciertas porciones del cuerpo de la madre hasta tener edad suficiente para alimentarse de presas.

En el presente estudio, se pretende aportar con información sobre la oogénesis de siete especies de cecílidos presentes en el Ecuador, a la vez que presentar una clasificación de los estadios, sencilla y general, para Gymnophiona.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES

Las dos especies utilizadas en este estudio como material vivo son: *Caecilia orientalis* y *C. abitaguae*. Para *C. orientalis* se realizaron salidas de campo hacia la estación “Yanayacu Biological Station and Center for Creative Studies” ubicada en la ciudad de Cosanga, en la provincia de Napo. Los especímenes fueron encontrados por medio de levantamiento de porciones extensas de vegetación junto a la estación y utilizando palas y machetes para remover la tierra. Las especies *C. abitaguae* y *C. tentaculata* fueron colectadas por el personal del museo QCAZ y la Universidad Tecnológica Indoamérica UTI respectivamente (Anexo 1). El tejido gonadal utilizado para esta investigación fue donado por los museos.

4.2 TABLA DE OOGÉNESIS

A los animales vivos, se los sometió a ovariectomías en las cuales se anestesió a los individuos con MS-222. Se realizó un corte en el tercer cuarto del cuerpo hacia el plano distal, por un costado. Al encontrar el ovario, se cortó una porción del mismo y se lo almacenó en Solución Salina para anfibios de Ringer (SARS, por sus siglas en inglés). Se cerró la herida con hilo de sutura y se llevó al individuo a recuperación. El tejido extraído se dividió en tres porciones, de las cuales, la primera porción fue fijada en RNAlater® Solution de Ambion, incubada por una noche a temperatura ambiente y luego fue almacenado a -20°C. La segunda porción fue fijada en solución Smith's y permaneció por dos días a temperatura ambiente. Luego fue transferida a formaldehído al 1,5% y finalmente fue almacenada a 4°C. La tercera porción fue fijada en solución MEMFA por dos horas a temperatura ambiente, luego se cambió a etanol al 100%

donde permaneció por media hora a temperatura ambiente, para después ser almacenada a -20°C.

Para la tabla de la oogénesis se utilizaron cinco especies adicionales de cecílicos ecuatorianos (*Caecilia tentaculata*, *C. nigricans*, *C. pachynema*, *C. leucocephala*, *C. guntheri*), los cuales se encuentran en las colecciones del museo QCAZ de la PUCE, en la división de herpetología, y en la colección del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales, en la sección de herpetología (Anexo 1). El tejido se extrajo de igual manera que de los especímenes vivos, y se colocaron las muestras en tubos de ensayo en etanol al 70%. Luego, estas muestras pasaron por un proceso de rehidratación reduciendo la cantidad de etanol en lavados de 30 minutos hasta finalmente ser incubadas en formaldehído al 1.5%. Este tejido fue enviado al laboratorio de histología del área de patología del Hospital Oncológico Solca, donde se realizaron cortes del tejido con micrótopo, luego de ser embebidos en parafina. Los tejidos fueron luego tinturados con eosina-hematoxilina y sellados.

La metodología utilizada para la manipulación y eutanasia de los animales está basada en las pautas obtenidas de Wright y Whitaker (2001) y la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (2013)

4.3 ANÁLISIS DE LA OOGÉNESIS

Se microfotografió a la mayor cantidad de oocitos encontrados en buen estado en las placas, con los programas “Infinity Analyze Software” para la cámara “Lumenera USB Scientific camera -Infinity 1” acoplado a un estereoscopio. También se utilizó un microscopio de Fluorescencia con la cámara Olympus DP72-TWAIN acoplado. Se tomó las medidas del diámetro de la célula y de los núcleos. Se estimaron los valores mayores y menores entre los que se encuentran los estadios determinados y se calculó

la media y desviación estándar para cada estadio, cada especie y para cada estadio por especie. Finalmente, se describió el tamaño del núcleo, posición y estado, además de las características del citoplasma de la célula.

Se determinaron cinco estadios de la ovogénesis considerando cuatro características principales: (1) Las diferencias del tamaño, (2) presencia de capa vitelina, (3) organización de las envolturas foliculares y (4) formación y distribución de las plaquetas de yema. De los cinco estadios, tres son previtelogénicos. El estadio I corresponde a los oogonios inmersos en los nidos germinales, el estadio II corresponde a los oocitos primarios. El estadio III corresponde a los oocitos previtelogénicos. El estadio IV corresponde a los oocitos vitelogénicos tempranos. El estadio V corresponde a los vitelogénicos tardíos. Estas divisiones son una adaptación de la clasificación de Gomes (2010) y Pewhom (2015), y es una clasificación que engloba generalidades para todas las especies.

5. RESULTADOS

Se analizaron siete especies. La anatomía del sistema reproductivo coincide con las descripciones realizadas previamente para otras especies de *Gymnophiona*.

En total, se analizaron 124 oogonios y oocitos, de los cuales, 15 pertenecen a *C. abitaguae*. De esta especie, el oogonio más pequeño (estadio I) mide 16,8 μm y el oocito de mayor diámetro es de 1692,55 μm (estadio V). La especie *C. guntheri* se analizó con 27 oogonios y oocitos de entre los cuales el oogonio más pequeño (Estadio I) es de 15,52 μm , y el oocito más grande es de 4989,41 μm de diámetro (estadio V). Con 9 oogonios y oocitos se analizó a la especie *C. leucocephala*, cuyo oogonio más pequeño (estadio I) es de 19,49 μm y el oocito mayor (estadio V) es de 2222,88 μm . Para *C. nigricans* se utilizaron 11 oogonios y oocitos, con 16,85 μm para el oogonio más pequeño, y 4068,06 μm para el oocito más grande. De *C. orientalis* se utilizaron 29 oogonios y oocitos, y sus valores mínimo y máximo son 11,43 μm y 3738,99 μm respectivamente. 21 oogonios y oocitos fueron contados para *C. pachynema*, con un valor mínimo de 16,06 μm y uno máximo de 3483,03 μm . Finalmente, para la especie *C.* un mínimo de 12,23 μm . Estos valores se resumen en la Tabla 1.

Estadio I: Oogonios. Estas células se encuentran agrupadas en porciones epiteliales del ovario llamadas nidos germinales. El citoplasma presenta coloración por H&E (Eosina-hematoxilina) y no poseen envoltura folicular, sino que están “desnudos”. La diferencia entre el núcleo y el tamaño de la célula es casi nula (Fig. 1 A).

Estadio II: Oocitos primarios. Pueden encontrarse en agrupaciones, solitarias y fuera o dentro de los nidos germinales, y suelen estar asociados a los oogonios. El citoplasma no está tinturado por H&E, no poseen envolturas celularizadas y no se observa la membrana vitelina (Fig 1 A).

Estadio III: Oocitos previtelogénicos. Se caracterizan principalmente por la ausencia de plaquetas de yema en el citoplasma. Los núcleos son de gran tamaño con respecto a la célula y poseen uno o varios nucleolos. El citoplasma es nuevamente visible al ser tinturado con H&E y presenta parches proteicos dispersos. Los oocitos se encuentran rodeados de una o varias capas de células foliculares que no se diferencian entre sí. En algunos se puede evidenciar la presencia de membrana vitelina (en el caso de aquellos que estén por entrar a vitelogénesis) (Fig 1 B).

Estadio IV: Oocitos vitelogénicos tempranos. Aumentan en tamaño, se encuentran envueltos en una capa de células foliculares conformada por células foliculares cuboidales, también llamadas granulosa y varias capas foliculares irregulares llamadas teca. La presencia de la membrana vitelina es más evidente y se observa una estratificación en el citoplasma debido a la formación de plaquetas de yema en la periferia de la célula. Estas plaquetas son relativamente pequeñas y no ocupan todo el citoplasma. En este estadio todavía se observan parches proteicos alejados de las plaquetas y el núcleo es de un tamaño menor frente a la célula con respecto del estadio anterior. El número de nucléolos aumenta (Fig 1 C).

Estadio V: Oocitos Vitelogénicos Tardíos. El tamaño aumenta significativamente por la cantidad de plaquetas de yema que acumulan. Estas plaquetas son de gran tamaño y ocupan todo el citoplasma; son mayores en el centro del oocito. Se puede ver la membrana vitelina, la granulosa y la teca. La diferencia de tamaño entre el núcleo y la célula, y el número de nucléolos es notablemente mayor que en los estadios anteriores (Fig 1-D).

A partir de estas generalidades se encontraron, además, diferencias para cada especie (Tabla 2; Tabla 4):

5.1. *Caecilia abitaquae*. –

Los estadios I y II se encuentran dentro de los nidos germinales (Fig 2A). En esos observamos oogonios asociados a los oocitos primarios y en ninguno de estos estadios se observan capas celularizadas que los envuelvan; tampoco se observa membrana vitelina. Los oogonios miden de 0 a 20 μm mientras que los oocitos primarios miden $22 \pm 4,47 \mu\text{m}$ con núcleos de 10 μm . El estadio III tiene una media de $571,42 \pm 75,59 \mu\text{m}$ y aquí se observan los parches proteicos en el citoplasma (Fig 2B). La membrana vitelina es visible a partir de las 700 μm , lo que quiere decir que está desde el final del tercer estadio. En el cuarto estadio se observa la membrana vitelina, se observa diferenciación entre la teca y la granulosa y el citoplasma presenta plaquetas de yema que lo estratifican. Miden 1000 μm (Fig 2C). En el quinto estadio, desde las 1000 μm , las plaquetas de yema son de gran tamaño y ocupan la parte central del oocito (Fig 2D). Miden $1666,66 \pm 577,35 \mu\text{m}$.

5.2. *Caecilia tentaculata*. –

Los oogonios pueden llegar a medir hasta 10 μm , y se encuentran “desnudos” dentro de los nidos germinales, al igual que los oocitos primarios que miden $12,5 \pm 5 \mu\text{m}$ (Fig 3A). El estadio III presenta parches proteicos y mide $400 \pm 141,42 \mu\text{m}$ (Fig 3B). La membrana vitelina es visible a partir de las 600 μm que corresponden al estadio IV; de igual manera, a partir de este momento, se observa un leve ingreso de vitelogenina en los folículos mostrando un citoplasma estratificado (Fig 3C). El estadio V en esta especie mide $2800 \pm 447,21 \mu\text{m}$ y la diferenciación de las membranas que recubren al oocito en teca y granulosa se da en este punto (Fig 3D).

5.3. *Caecilia guntheri*. –

Para el estadio I se registran folículos de hasta 20 μm , y ninguno de ellos se encuentra envuelto por células foliculares. Los folículos II pueden medir $21,81 \pm 4,04 \mu\text{m}$, “desnudos” y asociados a los oogonios en los nidos germinales (Fig 4A). El estadio III mide $244,44 \pm 142,40 \mu\text{m}$ y se observan parches proteicos (Fig 4B). La membrana vitelina, La aparición de plaquetas de yema en una manera estratificada y la diferenciación de las capas envolventes del folículo son evidentes recién a partir del estadio IV, que mide 800 μm (Fig 4C). El estadio V se diferencia por su tamaño, $3600 \pm 1140,17 \mu\text{m}$ y por la invasión total del citoplasma por plaquetas de yema de gran tamaño principalmente acumuladas en el centro del oocito (Fig 4D).

5.4. *Caecilia orientalis*. –

En los nidos germinales el estadio I va desde las 0 a las 10 μm , y el estadio II mide $18,33 \pm 5,68 \mu\text{m}$. Todas estas células se encuentran en nidos germinales dentro del epitelio y ninguna posee membranas envolventes (Fig 5A). En el estadio III aparece la membrana vitelina al mismo tiempo que se observan los parches proteicos en el citoplasma. Los folículos miden $250,71 \pm 78,57 \mu\text{m}$ (Fig 5B). El estadio IV mide 1000 μm y desde aquí se observa la especialización de las capas foliculares y la formación de las plaquetas de yema, estratificando el citoplasma (Fig 5C). En el quinto estadio se observan las plaquetas aumentadas en tamaño y en el centro del citoplasma. Los folículos miden $3500 \pm 707,10 \mu\text{m}$ (Fig 5D)

5.5. *Caecilia pachynema*. –

En los nidos germinales los oogonios miden desde 0 hasta 20 μm , y los oocitos primarios miden $23,3 \pm 5,16 \mu\text{m}$. Estos presentan las mismas características que sus similares en las otras especies (Fig 6A). El estadio III mide $168,57 \pm 53,98 \mu\text{m}$ y

presenta parches proteicos en el citoplasma (Fig 6B). El estadio IV mide $369,68 \pm 72,5$ μm y desde aquí se observa la membrana vitelina y la formación de las plaquetas de yema, dando paso a la estratificación del citoplasma. En este estadio también se observa la diferenciación de las capas foliculares, pero es una formación tardía, pues ocurre a las 800 μm (Fig 6C). El estadio V mide $1825 \pm 1372,04$ μm (Fig 6D)

5.6. *Caecilia nigricans*. –

El estadio I mide desde 0 hasta 20 μm y el estadio II mide 20 μm . En los nidos germinales los oocitos no están rodeados por capas foliculares. (Fig 7A). El estadio III mide $366,66 \pm 57,73$ μm y se observan parches proteicos (Fig 7B). A partir del final de este estadio se puede observar la membrana vitelina presente en el folículo. El estadio IV tiene una media de $800 \pm 282,84$ μm y a partir de ese estadio se observa la diferenciación de membranas extracelulares del oocito, junto con la formación de plaquetas de yema, estratificación (Fig 7C). El estadio V mide $2666,66 \pm 1154,70$ μm y en este las vesículas de yema han entrado por completo al oocito y son de gran tamaño (Fig 7D).

5.7. *Caecilia leucocephala*. –

En los nidos germinales, el estadio I puede medir desde 0 hasta 20 μm y el estadio II mide 20 μm . Estos estadios concuerdan con las descripciones de las otras especies (Fig 8A). Durante el estadio III se observa a la membrana vitelina a partir de las 300 μm y la especificación de membranas extracelulares desde las 400 μm . En este estadio los folículos miden $266,66 \pm 152,75$ μm (Fig 8B). A partir del estadio IV se observa la formación de plaquetas de yema en el citoplasma haciéndolo estratificado y los folículos miden 1000 μm (Fig 8C). Finalmente, en el estadio V se observa que las

plaquetas han ingresado completamente en el citoplasma y han crecido en tamaño. Los folículos, en este estadio miden $1500 \pm 707,10 \mu\text{m}$ (Fig 8D)

El desplazamiento del núcleo hacia la corteza del folículo es una característica importante, pero en este caso hemos decidido obviarlo dentro de la clasificación debido a que los métodos de fijación del tejido no fueron óptimos. Al ser especímenes de museo la fijación se realizó en etanol directamente, y para este estudio fue necesario rehidratarlo. Por esto y por el tiempo que ha pasado desde su fijación, muchos de estos folículos no se encontraban en condiciones óptimas para el estudio y muchos perdieron su forma.

En las especies *C. abitaguae*, *C. nigricans*, *C. orientalis* y *C. leucocephala* se puede ver la membrana vitelina antes de que las plaquetas de yema se empiecen a acumular, mientras que en las especies *C. guntheri*, *C. pachynema* y *C. tentaculata* la yema y la membrana vitelina son observadas desde el mismo estadio. La acumulación de yema en *C. abitaguae*, *C. nigricans*, *C. orientalis* y *C. guntheri* se produce al mismo tiempo que la diferenciación de las capas envolventes del oocito; en *C. leucocephala* se da antes y en *C. pachynema* y *C. tentaculata* se da después. El inicio de los tres procesos aquí analizados se da desde el estadio III en *C. abitaguae*, *C. nigricans*, *C. orientalis*, *C. leucocephala* y *C. pachynema*, mientras que para *C. guntheri*, y *C. tentaculata* se da desde el estadio IV (Fig 9)

6. DISCUSIÓN

Para la biología reproductiva de los cecílidos hay estudios exhaustivos histológicos en hembras, pero son restringidas a un número limitado de especies de cecílidos (Masood-Parveez y Nadkarni, 1993 a, b; Wake, 1977; Berois y de Sá, 1988; Wake y Dickie, 1998; Beyo, *et al.*, 2007 a, b; Beyo, *et al.*, 2008 a, b; Beyo, *et al.*, 2010; Gomes, 2010; Pewhom, *et al.*, 2015; Raquet, *et al.*, 2015).

Dumont (1972) establece seis estadios de la oogénesis para *X. laevis*; y en este estudio se basan muchos autores para describir los oocitos de diferentes anfibios (Hoque y Saidapur, 1994; del Pino, 1989). Para cecílidos hay una clasificación alternativa, propuesta por Exbrayat (2006), en la que se consideran pocos aspectos citológicos. Los estadios según este autor son seis en total, coincidiendo en número con Dumont. De estos, los dos primeros estadios son generalmente rechazados por varios autores (Sharon, *et al.*, 1997; Beyo, *et al.*, 2007 a, b) por ser oogonios y oocitos primarios. El siguiente estadio es el de oocitos previtelogénicos, que puede variar ampliamente de tamaño. El cuarto estadio es el de los oocitos vitelogénicos donde ya se pueden observar plaquetas de yema y zona pelúcida. El quinto estadio corresponde a oocitos atrésicos, los cuales pueden estar en cualquier estadio del desarrollo. Finalmente, el sexto pertenece a los oocitos maduros y donde pueden observarse cuerpos lúteos.

Beyo *et al.*, por otro lado, en una serie de publicaciones (2007 a, b, 2008 a, b, 2010) hacen énfasis en la necesidad de unificación de definiciones en la oogénesis de cecílidos con otros anfibios. No propone su propia clasificación, sino que se adapta a la descripción de Dumont (1972).

En el presente estudio, por la poca disponibilidad de material en buen estado, no ha sido posible hacer un análisis estadístico más minucioso para los tamaños de los oocitos. En un panorama óptimo, se deberían obtener muestras de tejido a partir de animales criados desde su nacimiento hasta la adultez, incluso, apuntando a la obtención de huevos fertilizados (Exbrayat, 2006; Gomes, 2010; Pewhom, *et al.*, 2015). Algunas de las muestras utilizadas fueron obtenidas de especímenes de museo (QCAZ de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales), los cuales datan de la década de los 1980s, y todos ellos fijados en etanol y/o en formol 10%. Tres muestras fueron obtenidas en fresco, dando como resultado un tejido de mejor calidad para técnicas histológicas. Muchas características importantes del tejido se pierden al no ser fijado apropiadamente para análisis histológicos, desde la forma esférica de cada oocito, hasta la calidad de las organelas. De igual manera, el material genético no puede ser utilizado para técnicas moleculares con este tipo de fijaciones. A pesar de todos estos inconvenientes, se ha logrado obtener rangos de los tamaños y características altamente importantes para cada especie. Con eso, se ha descrito preliminarmente la ovogénesis para las siete especies de cecílicos. Decimos preliminarmente, puesto que como algunos autores lo mencionan, es necesario realizar análisis ultraestructurales de varios elementos que conforman los folículos como las organelas internas, las membranas externas, zona pelúcida, entre otras (Masood-Parveez y Nadkarni, 1993 a, b; Wake, 1977; Berois y de Sá, 1988; Wake y Dickie, 1998; Beyo, *et al.*, 2007 a, b; Beyo, *et al.*, 2008 a, b; Beyo, *et al.*, 2010). Incluso, los análisis se los debe realizar considerando el ciclo reproductivo de cada especie, debido a que la producción de ciertos estadios es mayor dependiendo de la etapa en el ciclo (Exbrayat, 2006; Gomes, 2010; Pewhom, *et al.*, 2015).

La posición del núcleo es una de las características más importantes utilizadas para la clasificación. En los nidos germinales (oogonios y oocitos primarios) se observó que el núcleo ocupa casi en su totalidad el espacio citoplasmático. Esto es especialmente en oogonios, pues los oocitos primarios pueden aumentar su tamaño; pero el núcleo es siempre predominante espacialmente. Como notamos en la Tabla 2, la media de los elementos en los nidos germinales es de 20 μm , mientras que la media de los núcleos de los mismos es de 10 μm , la mitad del tamaño. Para los oocitos previtelogénicos es un poco complicado extrapolar los datos de las medias para determinar la proporción de tamaño celular (300 μm de diámetro) y nuclear (70 μm de diámetro), debido a que en este estadio los oocitos varía entre el inicio y el final del estadio (Tabla 2). Sin embargo, el tamaño del núcleo es siempre menor que el estadio anterior en proporción al oocito, y es el inicio de la migración del núcleo hacia el polo animal. En el caso de los oocitos vitelogénicos el núcleo siempre es excéntrico. Por los problemas de fijación, no se puede evidenciar con precisión la posición de todos los oocitos. Por esta razón no se considera a esta característica como parte de los análisis realizados.

En la Tabla 1, observamos los valores máximos y mínimos de los oocitos para cada especie. *C. guntheri* es la especie con el mayor tamaño de oocito completamente crecido con 5000 μm . Los oocitos de mayor tamaño se encuentran en individuos a punto de iniciar el ciclo reproductivo (Gilbert, 2014). La especie con el oogonio de menor tamaño (estadio I) pertenece a *C. orientalis* con 10 μm . Si consideramos el tamaño del adulto, la especie *C. orientalis* sobresale debido a que el adulto es relativamente pequeño (625 mm) comparado con otras especies, como *C. guntheri* (1600 mm) (Greeney, *et al.*, 2008; Arteaga, 2015), pero sus oocitos pueden llegar a medir casi 4000 μm . Por otro lado, la especie *I. beddomei* presenta un caso peculiar en

el que el adulto puede medir hasta 275 mm, y sus oocitos pueden llegar a medir hasta 7500 μm (Tabla 4). Para *C. tentaculata* el oocito totalmente crecido mide 4000 μm , mientras que el adulto puede medir más de un metro de longitud (AmphibiaWebEcuador, 2016). Estos datos sugieren que el tamaño del adulto y el tamaño del oocito completamente crecido no están correlacionados en Gymnophiona (Anexo 2).

Como se ha mencionado anteriormente, por los hábitos fosoriales del orden, se complica su estudio. Todas las especies que incluimos en este estudio están relacionadas a bosques con alta humedad ya sean bosques siempre verdes, bosques nublados o bosques tropicales (AmphibiaWeb, 2016). Ecológicamente, la información es pobre, pero se han reportado algunas observaciones con respecto a las estrategias reproductivas. En la especie *T. compressicauda* se ha descrito cuidado parental de los huevos, con una fase larval (AmphibiaWeb, 2016). De otras especies, se sabe que *C. orientalis* son desarrolladores directos, es decir que las hembras depositan huevos en la tierra y de estos nacen individuos con características de adultos (Pérez, *et al.*, 2009), lo cual podría explicar el gran tamaño del oocito para esta especie en particular. En la Figura 11 se observa la filogenia de las especies en las que se ha descrito la oogénesis en cecílicos (Pyron y Wiens, 2011; San Mauro, *et al.*, 2014). Aquí se detalla el tipo de estrategia reproductiva que presentan, junto con el tamaño máximo de los oocitos completamente crecidos. Los anfibios que tienen desarrollo directo generalmente depositan huevos con tamaños grandes, como en el caso de *Eleutherodactylus coqui* (Revisado por Elinson y Beckham, 2011). De todas las especies previamente estudiadas, dos de ellas son especies vivíparas (*T. compressicauda*, *C. indistinctum*), y no se conoce el tamaño máximo del oocito completamente crecido; nueve especies son ovíparas, siendo una característica predominante. De cinco especies no se conoce si

son ovíparas o vivíparas, pero se presume que puedan ser ovíparas puesto que, según San Mauro, *et al.* (2014), la característica basal del orden es el viviparismo. Para la familia Caecilidae, el viviparismo se perdió inicialmente, y luego reapareció la condición ovípara. Tres del total de esas especies presentan estadio larval (*I. tricolor*, *I. beddomei*, *I. supachai*), seis son desarrolladores directos y de cuatro especies no se conoce el tipo de desarrollo.

Es conocido que las estrategias reproductivas pueden determinar el tamaño del huevo (Revisado por Elinson y Beckham, 2011) y por ende se dice que los animales con desarrollo directo pueden tener oocitos más grandes. En este caso, no se ve evidenciado esto considerando que la especie con el oocito de mayor tamaño es *I. beddomei* con 7500 μm y en su desarrollo presenta un estadio larval (Tabla 3, Tabla 4). Para *I. supachai* no se conoce el tamaño final de los oocitos, pero está reportada una media de 800 μm en el último estadio, lo cual podría indicar tamaños pequeños, y para *I. tricolor* se encuentran folículos de hasta 6000 μm . En el caso de los desarrolladores directos sí se encuentran folículos grandes, como para *G. ramaswamii*, *C. orientalis* y para *C. tentaculata*.

Como fue mencionado anteriormente, el anuro *E. coqui* es desarrollador directo y se cree que esta es la razón por la que tiene huevos de gran tamaño (3,5 mm). También está el caso de la estrella de mar *Henricia hayashi*, donde se ha demostrado lo mismo y con el aporte de una cascada metabólica específica para ARN ribosomales (Elinson, *et al.*, 2011; Isaeva, 2015). Considerando eso, se inferiría que los desarrolladores directos deberían presentar huevos de mayor tamaño que su contraparte bifásica, es decir que presentan estadio larval; pero en los cecílicos hemos visto que esta teoría no se cumple. De hecho, con estos datos, no se observa un verdadero patrón en el que se englobe estrategia reproductiva vs. tamaño del oocito.

Porcentualmente se ha comparado los tamaños de los oocitos de cada especie para determinar si el tiempo invertido en cada estadio está relacionado a la ontogenia (Fig 10). Con esta comparación, se puede observar que *C. nigricans*, *C. guntheri*, *C. orientalis*, *C. pachynema*, *C. tentaculata* e *I. beddomei* dedican más del 50% del crecimiento total para el último estadio. *C. abitaguae*, *C. leucocephala*, *I. tricolor* y *G. ramaswamii* utilizan exactamente el 50% del tiempo, y finalmente la única especie que dedica menos del 50% (75%) para este estadio es *I. supachaii*. Este dato coincide con la especie *Salamandra salamandra*, del orden Caudata. Los estadios I y II en todas las especies representan menos de 5% del crecimiento, e incluso para *I. bedomeii* esto es verdad hasta el estadio III. El crecimiento en el estadio IV es poco en general, y esto es una diferencia fuerte con la salamandra, que incrementa varios cientos de micrómetros durante la formación de plaquetas de yema. El clado *Ichthyophis* llama la atención por la disparidad del tiempo ocupado por las especies en cada estadio. Dentro del clado *Caecilia*, se observa que no hay un tiempo constante para los estadios.

Los parámetros principales para la clasificación de los folículos son: el tamaño, la vitelogénesis y la identidad de las membranas que rodean al oocito. A pesar de que la vitelogénesis es descrita generalmente como un evento sincronizado (Gilbert, 2014; Wolpert y Tickle, 2011), en los cecílicos no es así (Fig. 9). La modularidad en el desarrollo es un concepto que permite analizar los eventos en patrones de mosaico, y no como un total absoluto. Las heterocronías se definen como los cambios en el tiempo relativo del apareamiento de una característica (Martínez-Torres, *et al.*, 2015; Collins, *et al.*, 2016). Son un resultado de la modularidad en el desarrollo, estando presente a diferentes niveles, como los son celular o molecular. Las estrategias reproductivas son uno de los factores más importantes de determinación de heterocronías, pues en su proceso de diferenciación se da paso a cambios en la

ontogenia y los ciclos de vida de los animales (Bird, *et al.*, 2014; Revisado por Isaeva, 2015). En la vitelogénesis de cecílicos, se considera al apareamiento de la membrana vitelina y a la acumulación de plaquetas de yema como dos procesos diferentes. Afirmamos que son módulos semi-independientes, junto con la diferenciación de las capas que rodean al oocito, puesto que ninguno de estos procesos demuestra ser sincrónico en todas las especies. La única excepción a esto, sería la dependencia de la acumulación de yema y la diferenciación de las capas envolventes del oocito a la aparición de la membrana vitelina, puesto que no se observa en ningún caso que estos ocurran antes (Fig 9).

Las diferencias en la organización celular del huevo, como las diferencias en la vitelogénesis en este caso, en conjunto con los cambios en las estrategias reproductivas son considerados como heterocronías a nivel celular. Las diferencias en el tamaño final de los oocitos y la proporción del tiempo que se invierte en cada estadio resaltan como heterocronías a un nivel mayor (Bird, *et al.*, 2014). De lo que se conoce, el clado *Caecilia* es terminal, y parafilético. Las heterocronías son consideradas como un mecanismo principal para los cambios evolutivos (Martínez-Torres, *et al.*, 2015; Collins, *et al.*, 2016), y observando las características de la foliculogénesis y oogénesis, encontramos una posible relación entre las especies del género. Agrupando a las especies por el tamaño máximo del oocito completamente crecido, tenemos que *C. abitaguae* y *C. leucocephala* forman un grupo 1 (máximo 2000 μm), *C. pachynema* y *C. tentaculata* forman un grupo 2 (máximo 3000 μm), *C. orientalis* y *C. nigricans* forman un grupo 3 (máximo 4000 μm) y finalmente *C. guntheri* (máximo 5000 μm). Si comparamos estos grupos con las Figuras 9 y 10, vemos una relación entre características del inicio de los procesos de vitelogénesis, diferenciación membranal, y con el porcentaje de tiempo invertido en los estadios.

Para el grupo 1 el tiempo invertido en el estadio V (acumulación de yema) está entre el 40% y 50% del tiempo total del desarrollo de los oocitos. Las características vitelogénicas y membranales no coinciden en las dos especies, pero para ambas el tamaño en el que inicia la acumulación de yema es de 1000 μm . Para el grupo 2, se observa claramente que el apareamiento de la membrana vitelina y la acumulación de yema se dan al mismo tiempo, mientras que la separación de la membrana folicular en granulosa y teca se da posteriormente en el desarrollo. En este grupo se observa que la acumulación de yema en el oocito inicia a partir del 30% del proceso total de oogénesis. El grupo 3 también acumula yema a partir del 30%, pero en este caso, la diferenciación de membranas y la formación de yema son sincrónicas y posteriores a la aparición de membrana vitelina. Finalmente, para *C. guntheri*, la acumulación de yema se da desde que el oocito llega al 20% del crecimiento y los tres procesos son todos sincrónicos. Se observa que especies con oocitos más pequeños ocupan menor porcentaje de la oogénesis en el estadio V, mientras que las especies con oocitos más grandes utilizan un mayor porcentaje. Los oocitos se encuentran en constante síntesis de ARN, pero como Gurdon (1974) explica, los picos de síntesis de ARN de transferencia, ADN_r y ARNs varios se dan hasta poco después del inicio de la acumulación de yema. Luego de esta acumulación, se inicia la producción de ARN ribosomal. Eso implica que la mayoría del material necesario e indispensable para que el oocito esté listo para fertilizarse se sintetiza y acumula antes de la vitelogénesis, sugiriendo que la acumulación total de yema pudiera ser un proceso dispensable para la fertilización. Como se ha detallado, algunos de los oocitos inician la acumulación de yema (estadio V) antes que otros. Los cecílidos son especies que pueden resistir condiciones ambientales alteradas, como plantaciones (AmphibiaWeb, 2016). La diferencia del porcentaje del crecimiento total de oocitos en estadio V entre especies

podría indicar que aquellas con porcentajes mayores pueden responder mejor a posibles presiones ambientales. Si consideramos que las heterocronías son los medios para que ocurran cambios evolutivos, podríamos concluir que las coincidencias en la oogénesis dentro y fuera de los cecílicos agrupados por tamaño de oocito, pueden dar nociones sobre las relaciones filogenéticas entre las siete especies aquí analizadas. Estas aseveraciones deben ser comprobadas con estudios a futuro.

La característica ancestral de los cecílicos es bifásica y ovípara (San Mauro, *et al.*, 2014). Se observa que posteriormente se derivan la viviparidad y el desarrollo directo (Fig 11). Según la teoría, el clado basal (género *Ichthyophis*) debería tener folículos de un tamaño menor que de aquellos clados derivados, como por ejemplo el de *Caecilia* (Fig 11). Claramente no es este el caso, siendo que dentro del género los valores máximos de los oocitos son muy variados. Una de las posibles razones de estas diferencias puede ser la variación de roles ecológicos que cumplan las especies analizadas. Al ser animales fosoriales, los cecílicos son complicados de estudiar, y la información disponible sobre sus hábitos es muy escasa. Considerando ésta variable, queda abierta la opción de que sea una razón fuertemente asociada a la variación en los tamaños de los oocitos.

Con los resultados actuales, se concluye que Gymnophiona no concuerda con la teoría que propone una correlación entre el tamaño de huevo y la estrategia reproductiva, en la que los desarrolladores directos tienen huevos con tamaños mayores que los bifásicos. Para corroborar estos resultados, se deben realizar más estudios, obteniendo valores exactos del tamaño máximo de los oocitos de cada especie analizada aquí. También se concluye que la vitelogénesis es modular, y no un proceso unificado, debido a que en algunas especies es progresivo. Finalmente, con las

características del tejido gonadal se puede relacionar a las especies y aportar con evidencias que den luz sobre un grupo del cual se desconoce la filogenia.

El Ecuador es uno de los países más diversos en cuanto a anfibios se refiere. Alberga 566 especies descritas entre los tres órdenes, y Brasil y Colombia son los únicos países que lo superan en número. En total, existen 205 especies de cecílicos en el mundo, y 23 de estas especies (11%) se encuentran en Ecuador (AmphibiaWeb, 2016; AmphibiaWebEcuador, 2016). A pesar de esto, las bases de datos disponibles en línea proporcionan información limitada a la caracterización morfológica de la especie, mientras que el resto de datos se ignora (AmphibiaWeb, 2016; AmphibiaWebEcuador, 2016). Es por esta razón por la que todos los estudios con referencia a los cecílicos son de gran importancia en el mundo y para el Ecuador, donde la información es realmente escasa. Los datos sobre la ovogénesis en esos animales son muy importantes, pues, al ser estacionarios, se puede predecir el estado del ciclo reproductivo de los mismos sin necesidad de realizar varias colecciones. Se puede inferir el estado del ciclo reproductivo a partir de una sola hembra. En el caso de que tenga oocitos de estadio IV se puede determinar que la época de gestación está cerca, y si solo posee oocitos de estadios tempranos se puede decir que la época reproductiva terminó. Este es el primer reporte para el Ecuador de la ovogénesis de cecílicos en el que se engloban tantas especies, considerando que solo se ha reportado una, con un amplio rango de distribución en América del Sur.

De las 23 especies presentes en el Ecuador, sólo en una estaba descrita la ovogénesis (Gomes, 2010), ahora, son un total de ocho. Además de esto, este estudio también duplica la información mundial sobre la ovogénesis en cecílicos.

7. LITERATURA CITADA

- Arteaga, A. (2015). Günther's Caecilian. Retrieved April 29, 2016, from <http://www.tropicalherping.com/publications/books/mindo/caecilia-guntheri.html>
- AVMA. (2013). Guidelines for the Euthanasia of Animals (2013.0.1 ed.). Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Berois, N., & De Sa, R. (1988). Histology of the Ovaries and Fat Bodies of *Chthonerpeton indistinctum*. *Journal of Herpetology*, 22(2), 146–151.
- Beyo, R. S., Divya, L., Ramachandran, K., Oommen, O. V, & Akbarsha, M. A. (2010). Organization of the corpus luteum in a caecilian *Gegeneophis ramaswamii*. *J Endocrinol Reprod*, 14, 9–18.
- Beyo, R. S., Sreejith, P., Divya, L., Oommen, O. V, & Akbarsha, M. A. (2007). Assembly of ovarian follicles in the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: light and transmission electron microscopic study. *Zygote (Cambridge, England)*, 15(3), 199–213.
- Beyo, R. S., Divya, L., Oommen, O. V, & Akbarsha, M. A. (2008). Accumulation of yolk in a caecilian (*Gegeneophis ramaswamii*) oocyte: a light and transmission electron microscopic study. *Journal of Morphology*, 269(11), 1412–24.
- Beyo, R. S., Sreejith, P., Divya, L., & Oommen, O. V. (2007). Ultrastructural Observations of Previtellogenic Ovarian Follicles of the Caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*. *Journal of Morphology*, 342, 268–329.

- Beyo, R. S., Divya, L., Smita, M., Oommen, O. V., & Akbarsha, M. A. (2008). Stages in follicle cell/oocyte interface during vitellogenesis in caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: A transmission electron-microscopic study. *Cell and Tissue Research*, 331(2), 519–528.
- Bird, N. C., & Webb, J. F. (2014). Heterochrony, modularity, and the functional evolution of the mechanosensory lateral line canal system of fishes. *EvoDevo*, 5(1), 21.
- Collins, K. S., Crampton, J. S., Neil, H. L., Smith, E. G. C., Gazley, M. F., & Hannah, M. (2016). Anchors and snorkels: heterochrony, development and form in functionally constrained fossil crassatellid bivalves. *Paleobiology*, 42(02), 305–316.
- del Pino, E. M. (1989). Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. *Development*, 107, 169–187.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians* (Edición 1994). Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136(2), 153–179.
- Elinson, R. P., & Beckham, Y. (2002). Development in frogs with large eggs and the origin of amniotes. *Zoology*, 105(2), 105–117.
- Elinson, R. P., Sabo, M. C., Fisher, C., Yamaguchi, T., Orii, H., & Nath, K. (2011). Germ plasm in *Eleutherodactylus coqui*, a direct developing frog with large eggs. *EvoDevo*, 2(1), 20.

- Exbrayat, J. M. (2006). *Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)* (First Edit). Enfield: Science Publishers.
- Fletcher-Lazo, G. E. (2002). Taxonomía, distribución e historia natural de los ápodos (Amphibia: Gymnophiona) del Occidente Ecuatoriano. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Gilbert, S. F. (2014). *Developmental Biology* (Tenth Edit). Massachusetts: Associates Inc.
- Gomes, A. D. O. (2010). *Aspectos metabólicos e endócrinos do ciclo reprodutivo de cecílias dermatófagas Siphonops annulatus (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae) mantidas em cativeiro*. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.
- Gomez-Mestre, I., Pyron, R. A., & Wiens, J. J. (2012). Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution*, 66(12), 3687–3700.
- Greeney, H. F., Gelis, R. A., & Funk, W. C. (2008). Predation on Caecilians (*Caecilia orientalis*) by Barred Hawks (*Leucopternis princeps*) Depends on Rainfall. *Herpetological Review*, 39(392), 162–164.
- Gurdon, J. B. (1974). *The control of gene expression in animal development*. Oxford.
- Hoque, B., & Saidapur, S. K. (1994). Dynamics of oogenesis in the tropical anuran *Rana tigrina* (Amphibia: Ranidae) with special reference to vitellogenic cycles in wild-caught and captive flogs. *Journal of Biosciences*, 19(3), 339–352.

- Isaeva, V. V. (2015). Heterochronies, heterotopies, and cell resources of development in ontogenetic and evolutionary transformations. *Paleontological Journal*, 49(14), 1530–1537.
- Kloc, M., & Etkin, L. D. (2005). RNA localization mechanisms in oocytes. *Journal of Cell Science*, 118(2), 269–282.
- Kupfer, A., Nabhitabhata, J., & Himstedt, W. (2004). Reproductive ecology of female caecilian amphibians (genus *Ichthyophis*): a baseline study. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83, 207–217.
- Kupfer, A., Müller, H., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Greven, H., Nussbaum, R. A., & Wilkinson, M. (2006). Parental investment by skin feeding in a caecilian amphibian. *Nature*, 440(7086), 926–929.
- Laurin, M., Reisz, R. R., & Giron-dot, M. (2000). Caecilian viviparity and amniote origins: a reply to Wilkinson and Nussbaum. *Journal of Natural History*, 34(2), 311–315.
- Martínez-Torres, M., Rubio-Morales, B., Piña-Amado, J. J., & Luis, J. (2015). Hemipenes in females of the mexican viviparous lizard *Barisia imbricata* (Squamata: Anguidae): an example of heterochrony in sexual development. *Evolution & Development*, 17(5), 270–277.
- Masood-Parveez, U., Nadkarni, V. B. (1993). The Ovarian Cycle in an Oviparous Gymnophione Amphibian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). *Journal of Herpetology*, 27(1), 59–63.
- Masood-Parveez, U., Nadkarni, V. B. (1993). Morphological, Histological and Histochemical Studies on the Ovary of an Oviparous Caecilian, Morphological,

- Histological and Histochemical Studies on the Ovary of an Oviparous Caecilian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). *Journal of Herpetology*, 27(1), 63–69.
- Müller, H., & Natuurwetenschappen, F. der W. en. (2007). *Developmental morphological diversity in caecilian amphibians: systematic and evolutionary implications*. Leiden University Press.
- Pérez, O. D., Lai, N. B., Buckley, D., del Pino, E. M., & Wake, M. H. (2009). The morphology of prehatching embryos of *Caecilia orientalis* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae). *Journal of Morphology*, 270(12), 1492–502.
- Pewhom, A., Chumnanpuen, P., Muikham, I., Chatchavalvanich, K., & Srakaew, N. (2015). Microscopic structures of the ovary and female genital ducts of Supachai's caecilian, *Ichthyophis supachaii* Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona). *Acta Zoologica*, n/a–n/a.
- Pyron, A. R., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543–583.
- Raquet, M. A., Measey, G. J., & Exbrayat, J. M. (2015). Annual variation of ovarian structures of *Boulengerula taitana* (Loveridge 1935), a Kenyan caecilian. *African Journal of Herpetology*, 64(2), 116–134.
- San Mauro, D., Gower, D. J., Müller, H., Loader, S. P., Zardoya, R., Nussbaum, R. A., & Wilkinson, M. (2014). Life-history evolution and mitogenomic phylogeny of caecilian amphibians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 73, 177–189.

- Serclerat, H., Measey, J., Exbrayat, J. M., & Chavelier, C. (2011). Etude histologique des ovaries d'un amphibien gymnophione *Boulengerula boulengeri* pendant la periode de reproduction. *Revue Française D'Histotechnologie*, 24(1), 39–45.
- Sharon, R., Degani, G., & Warburg, A. M. R. (1997). Oogenesis and the Ovarian Cycle in *Salamandra salamandra* infraimmaculata Mertens (Amphibia; Urodela; Salamandridae) in Fringe Areas of the Taxon's Distribution. *J Morphol*, 231, 149–160.
- Sidova, M., Sindelka, R., Castoldi, M., Benes, V., Kubista, M., Houston, D. W., Castoldi, M. (2015). Intracellular microRNA profiles form in the *Xenopus laevis* oocyte that may contribute to asymmetric cell division. *Scientific Reports*, 5, 11157.
- Wake, M. H. (1977). Fetal Maintenance and its Evolutionary Significance in the Ambphibia: Gymnophiona. *Journal of Herpetology*, 11(4), 379–386.
- Wake, M. H., & Dickie, R. (1998). Oviduct Structure and Function and Reproductive Modes in Amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 506, 477–506.
- Wilkinson, M., Richardson, M. K., Gower, D. J., & Oommen, O. V. (2002). Extended embryo retention, caecilian oviparity and amniote origins. *Journal of Natural History*, 36(18), 2185–2198.
- Wolpert, L., & Tickle, C. (2011). *Principles of Development* (Fourth Edi). Kendallville: Oxford University Press.
- Wright, K. M., & Whitaker, B. R. (2001). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry* (Original E). Malabar: Keiger Publishing Company.

AmphibiaWeb. (2016). Retrieved April 6, 2016, from

<http://www.amphibiaweb.org/search/index.html>

AmphibiaWebEcuador. (2016). Retrieved May 3, 2016, from

<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador/Default.aspx>

FIGURAS

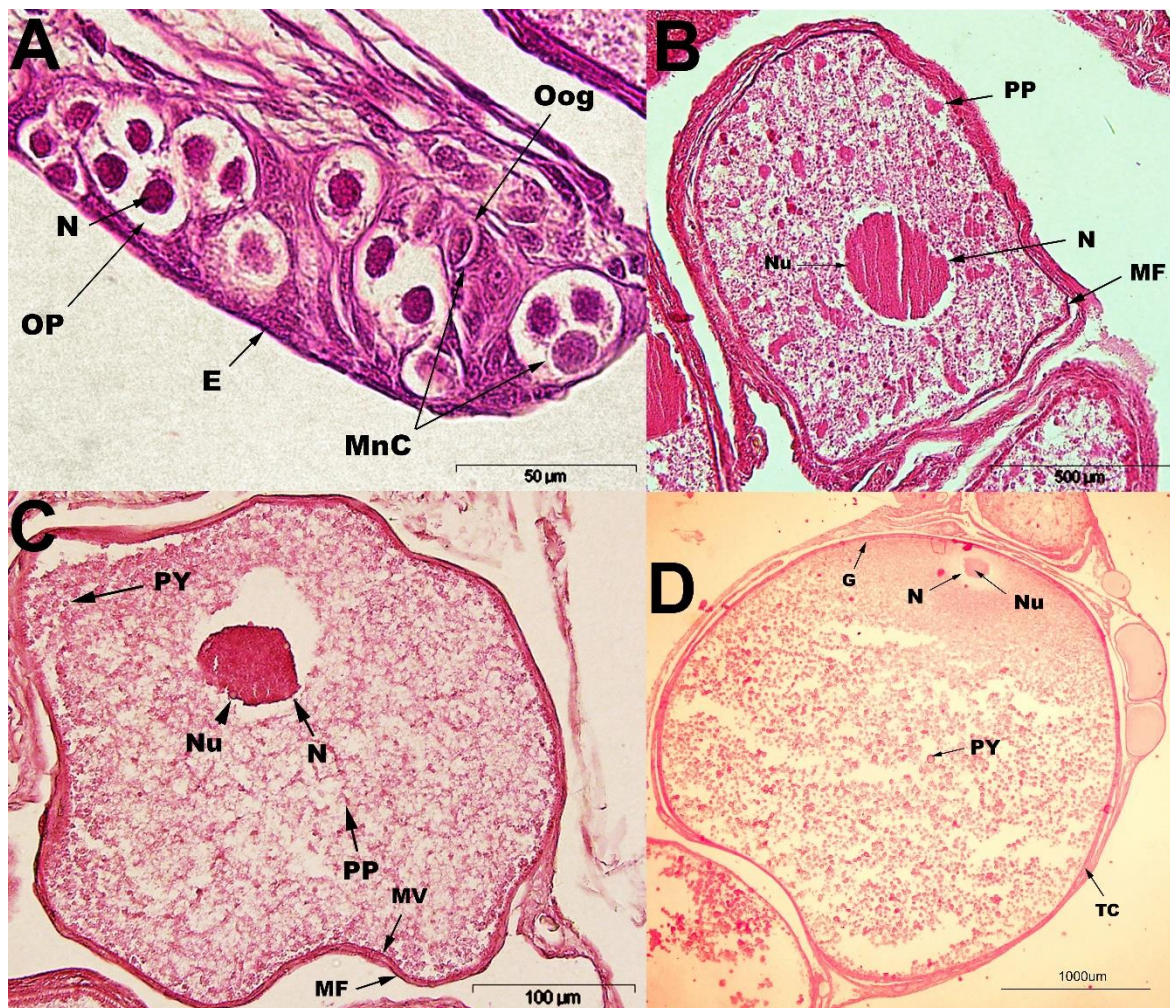


Fig. 1 Estadios en oogénesis de cecílicos. - A) Nido germinal, estadios I y II (*C. abitaguae*) B) Oocito estadio III (*C. guntheri*) C) Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma, la membrana vitelina y la membrana folicular aún no diferenciada en Granulosa y Teca (*C. nigricans*) D) Oocito estadio V (*C. tentaculata*)

OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Nu- Nucleolo; Oog- Oogonio; E- Tejido Epitelial; MnC- Membrana no Celularizada; PP-Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

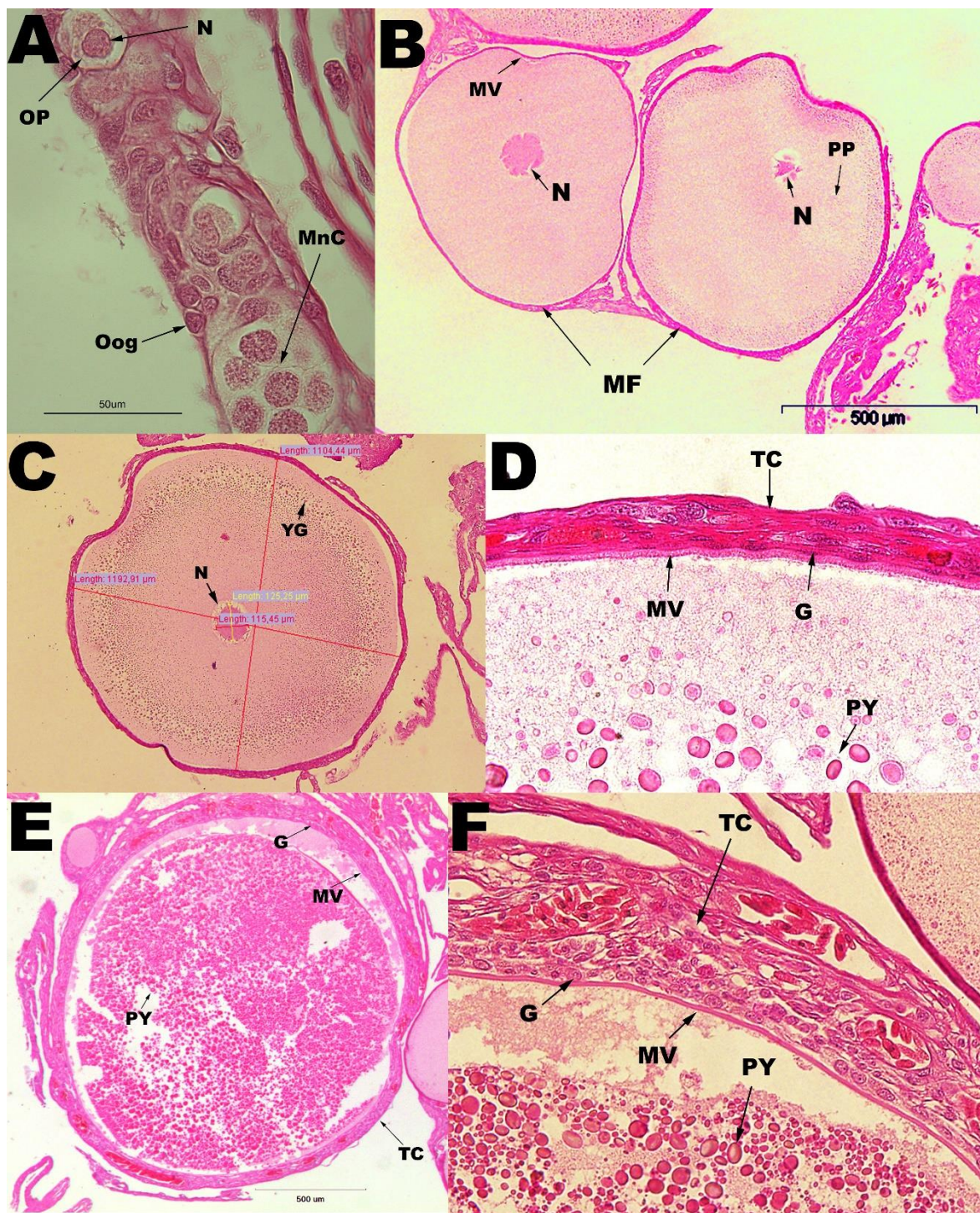


Fig. 2 Estadios en oogénesis de *C. abitaguae*. - **A)** Nido germinal, estadios I y II **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle de membrana de oocito estadio IV **D)** Oocito estadio V **D.1)** Detalle de membrana de oocito estadio V.

OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; MnC- Membrana no Celularizada; PP- Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

5

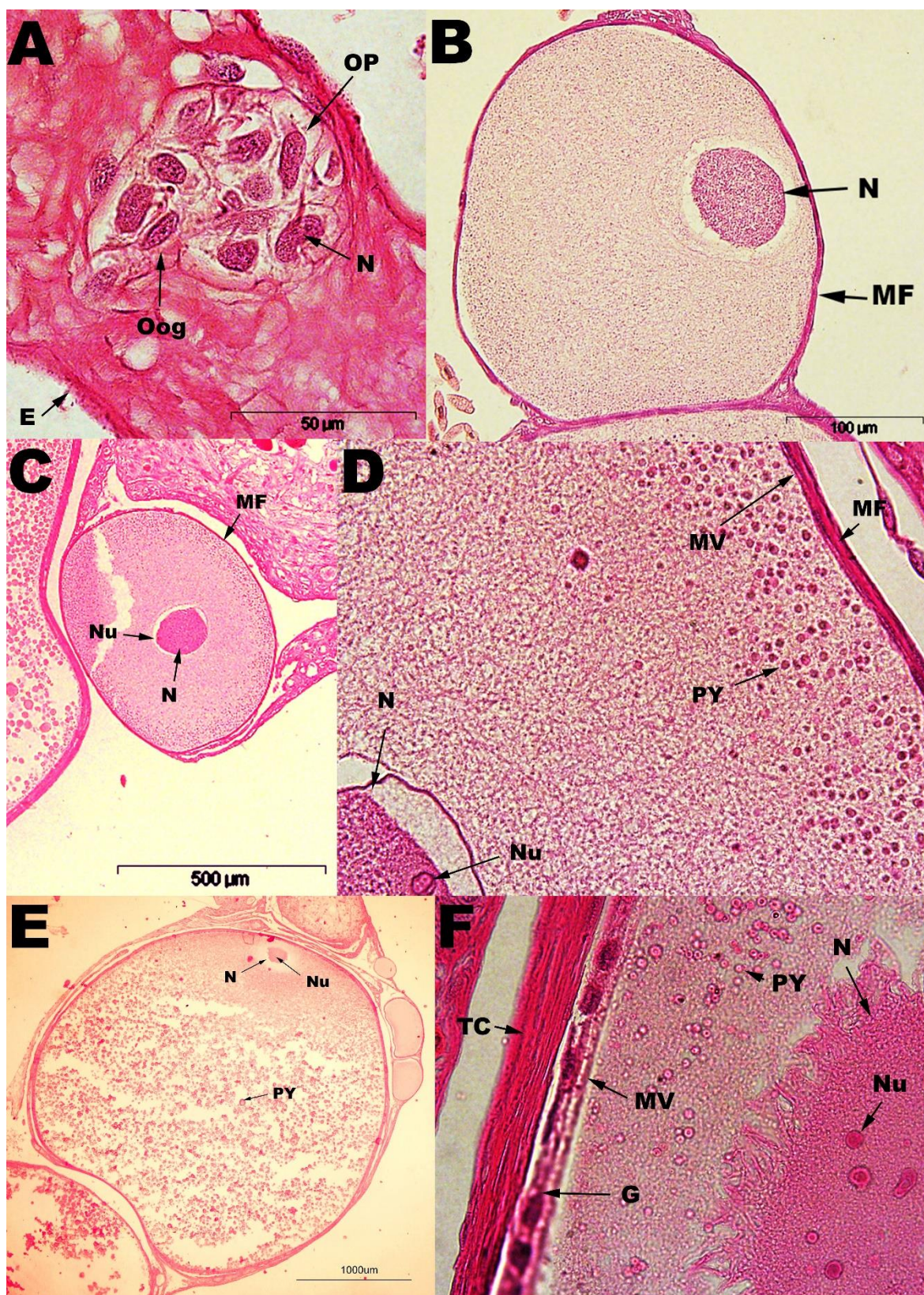


Fig. 3 Estadios en oogénesis de *C. tentaculata*. - **A)** Nido germinal, estadios I y II **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle de la membrana de oocito estadio IV **E)** Estadio V **F)** Detalle de la membrana y núcleo de oocito estadio V.

E- Tejido Epitelial; OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; Nu- Nucleolo; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

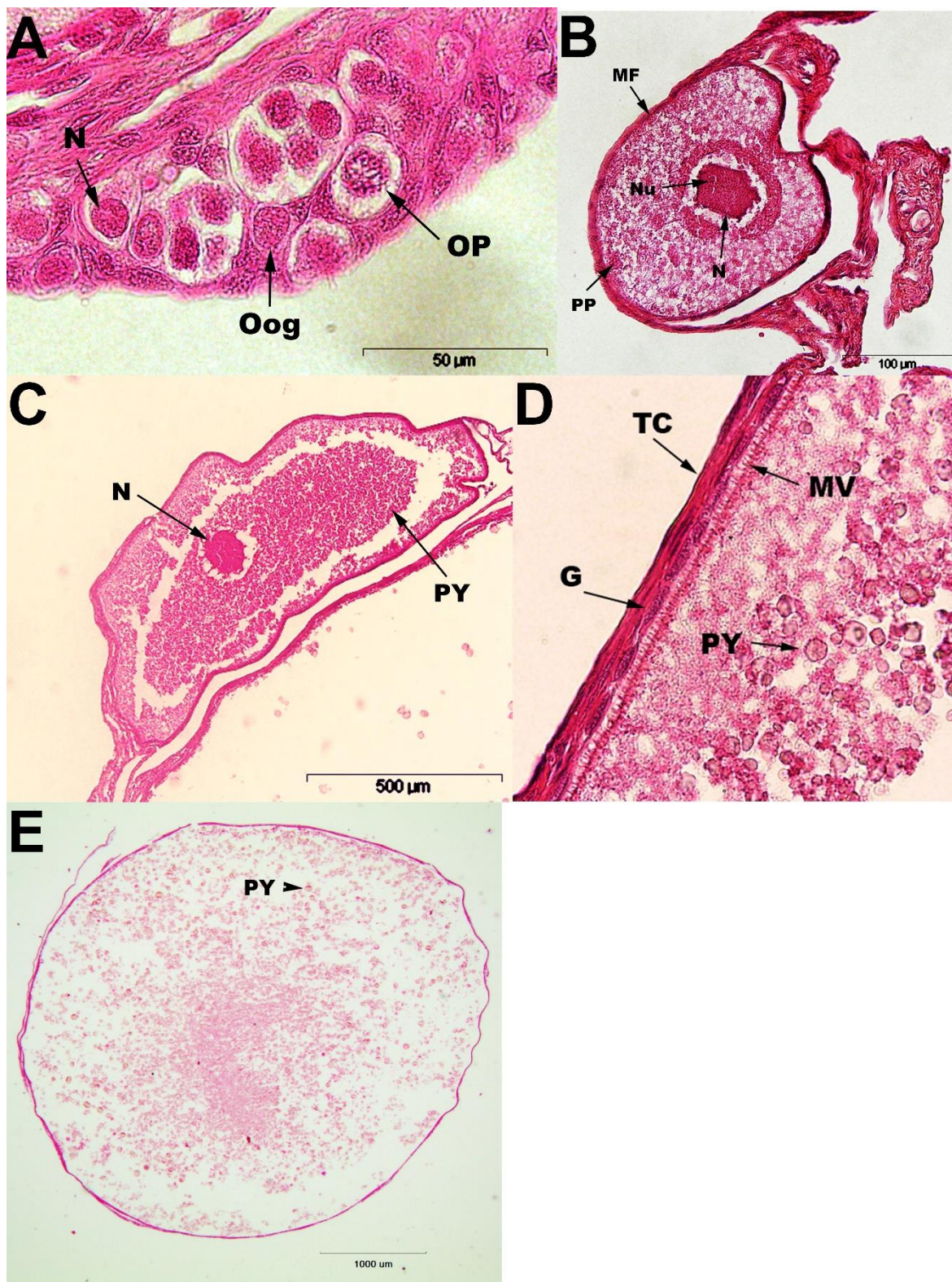


Fig. 4 Estadios en oogénesis de *C. guntheri*. - **A)** Nido germinal, estadios I y II **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle membrana de oocito estadio IV **E)** Oocito estadio V

OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; PP-Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

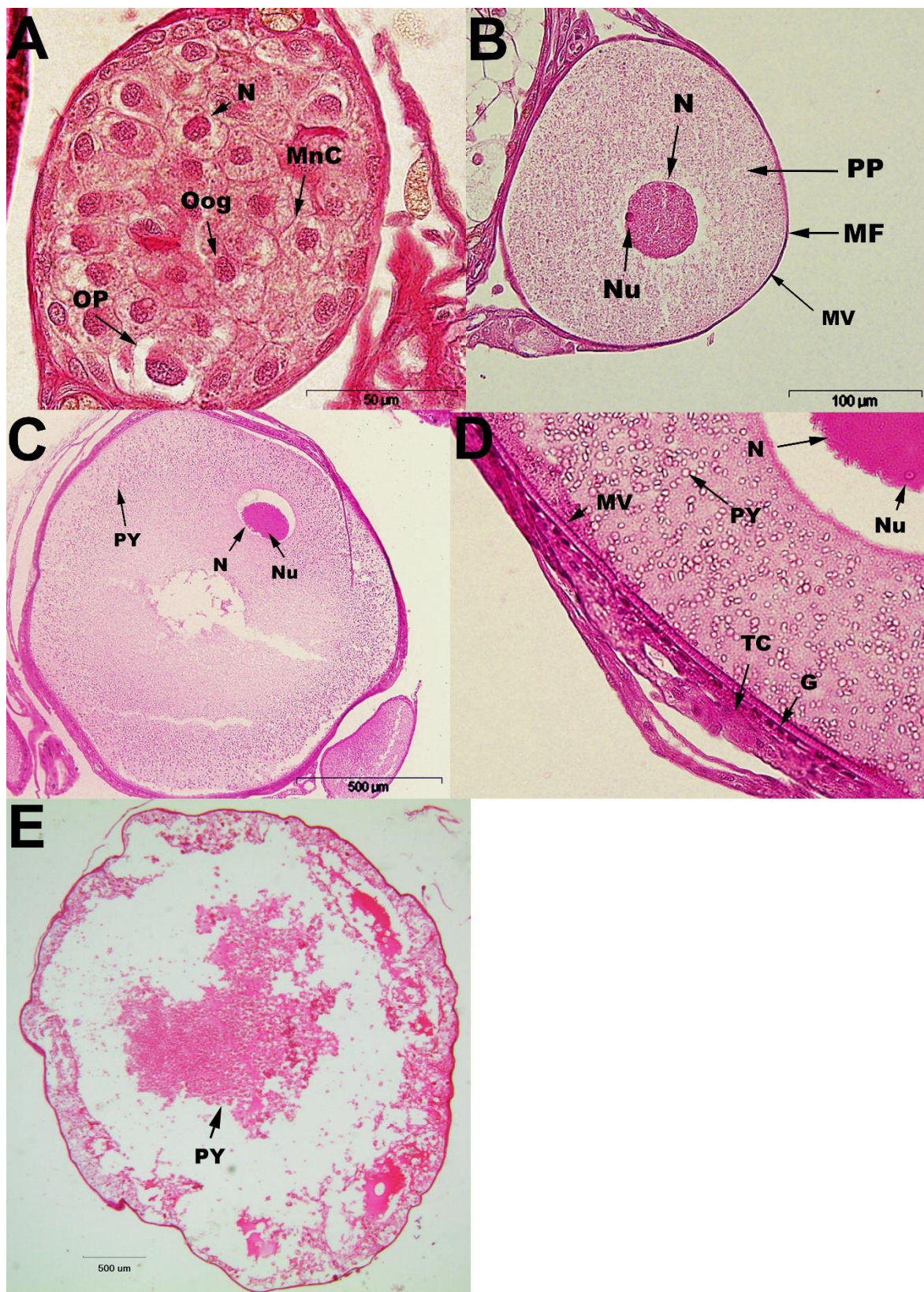


Fig. 5 Estadios en oogénesis de *C. orientalis*. - **A)** Nido germinal, estadios I y II **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle membrana de oocito estadio IV **E)** Oocito estadio V

OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; MnC- Membrana no Celularizada; Nu- Nucleolo; PP-Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

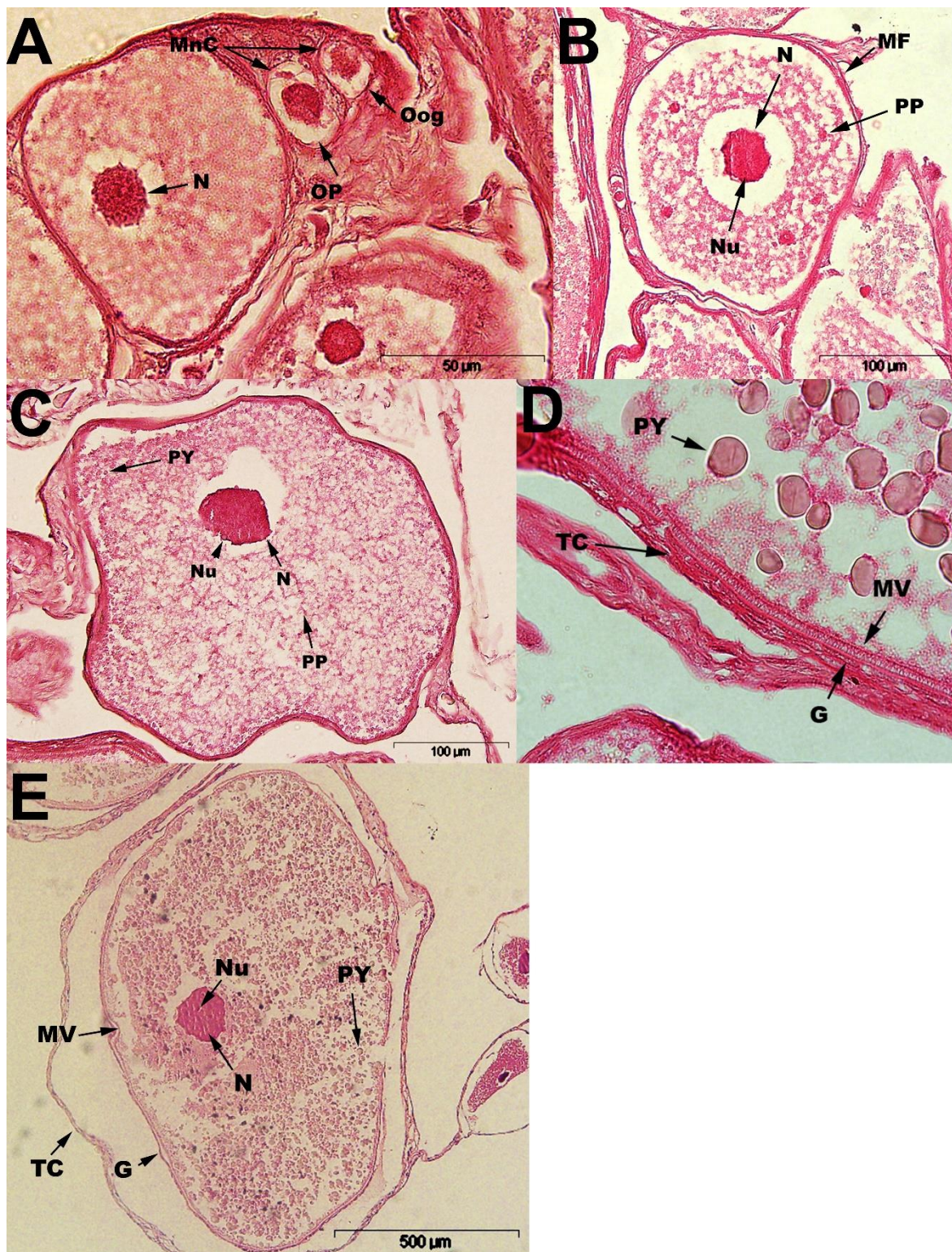


Fig. 6 Estadios en oogénesis de *C. pachynema*. - **A)** Nido germinal, estadios I y II **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle membrana de oocito estadio IV **E)** Oocito estadio V

OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; MnC- Membrana no Celularizada; Nu- Nucleolo; PP-Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

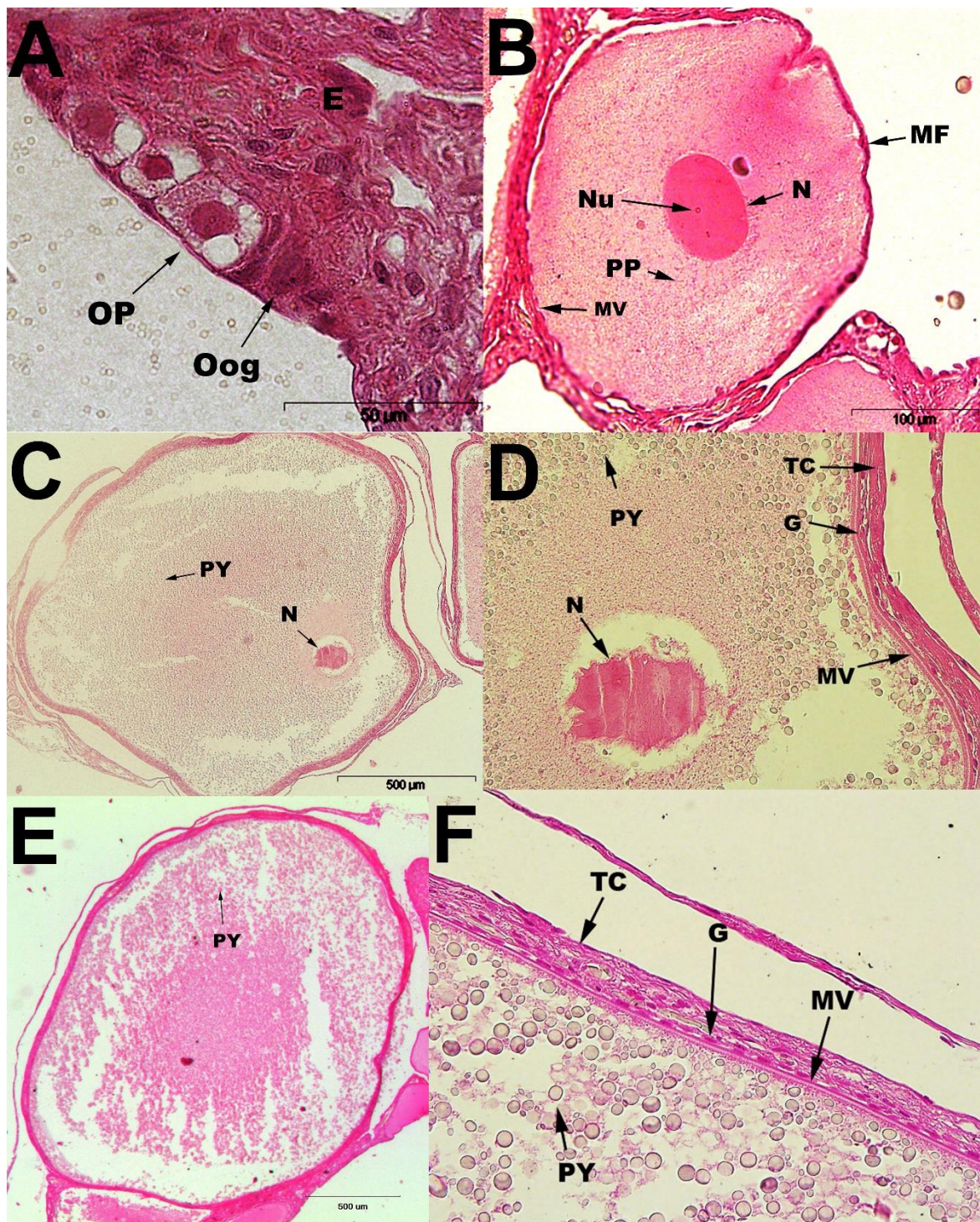


Fig. 7 Estadios en oogénesis de *C. nigricans*. - **A)** Nido germinal, estadios I y II **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle membrana de oocito estadio IV **E)** Oocito estadio V **F)** Detalle de membrana de oocito en estadio V

E- Tejido Epitelial; OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; MnC- Membrana no Celularizada; Nu- Nucleolo; PP-Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

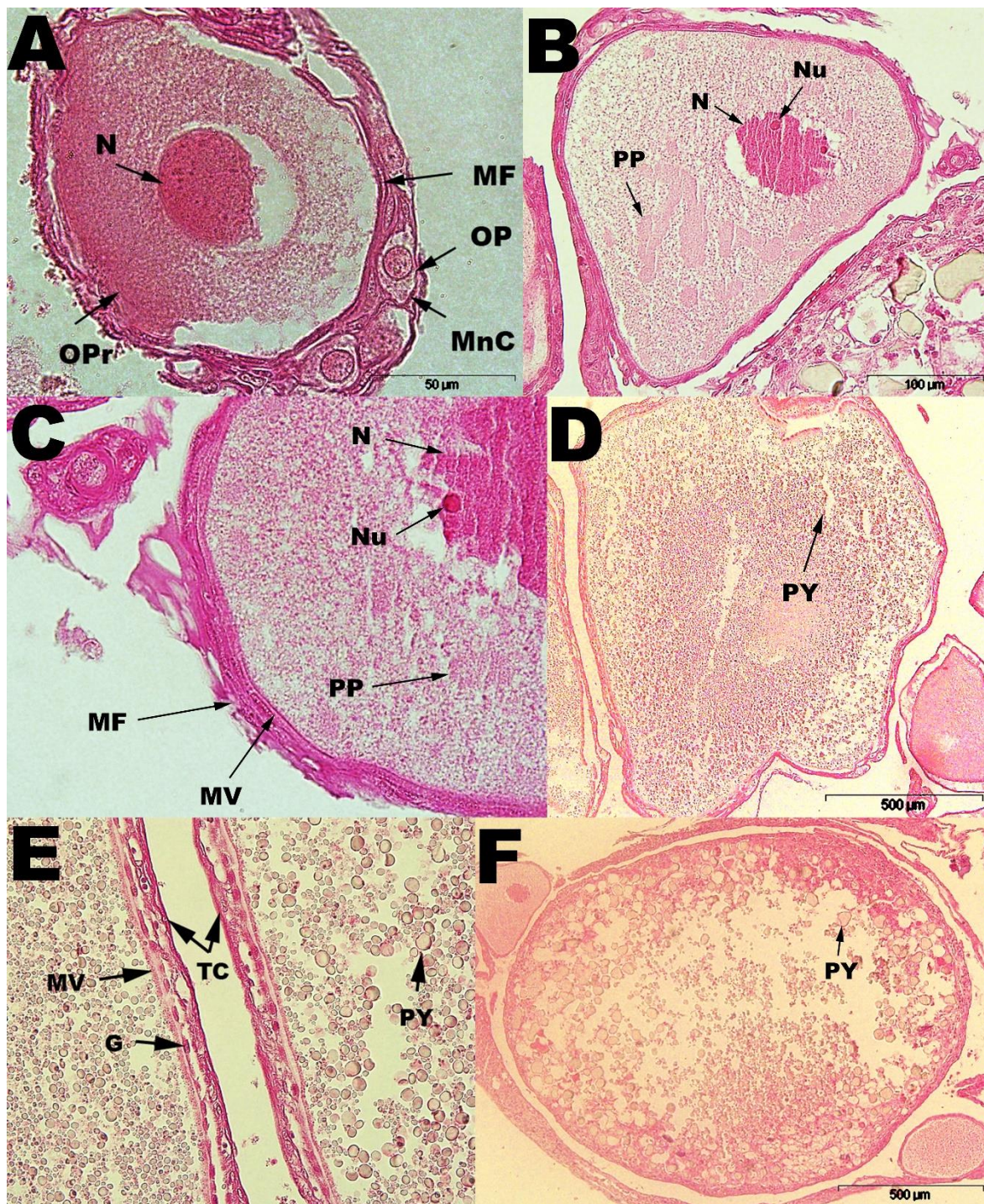


Fig. 8 Estadios en oogénesis de *C. leucocephala*. - **A)** Nido germinal, estadios II y III **B)** Oocito estadio III **C)** Oocito estadio IV. Se puede ver la estratificación en el citoplasma **D)** Detalle membrana de oocito estadio IV **E)** Oocito estadio V **F)** Detalle de membrana de oocito en estadio V

OP- Oocito Primario; N-Núcleo; Oog- Oogonio; MnC- Membrana no Celularizada; OPr- Oocito Previtelogénico; Nu- Nucleolo; PP-Parche Proteico; MF- Membrana Folicular; PY- Plaqueta de Yema; TC- Teca; MV- Membrana Vitelina; G- Granulosa

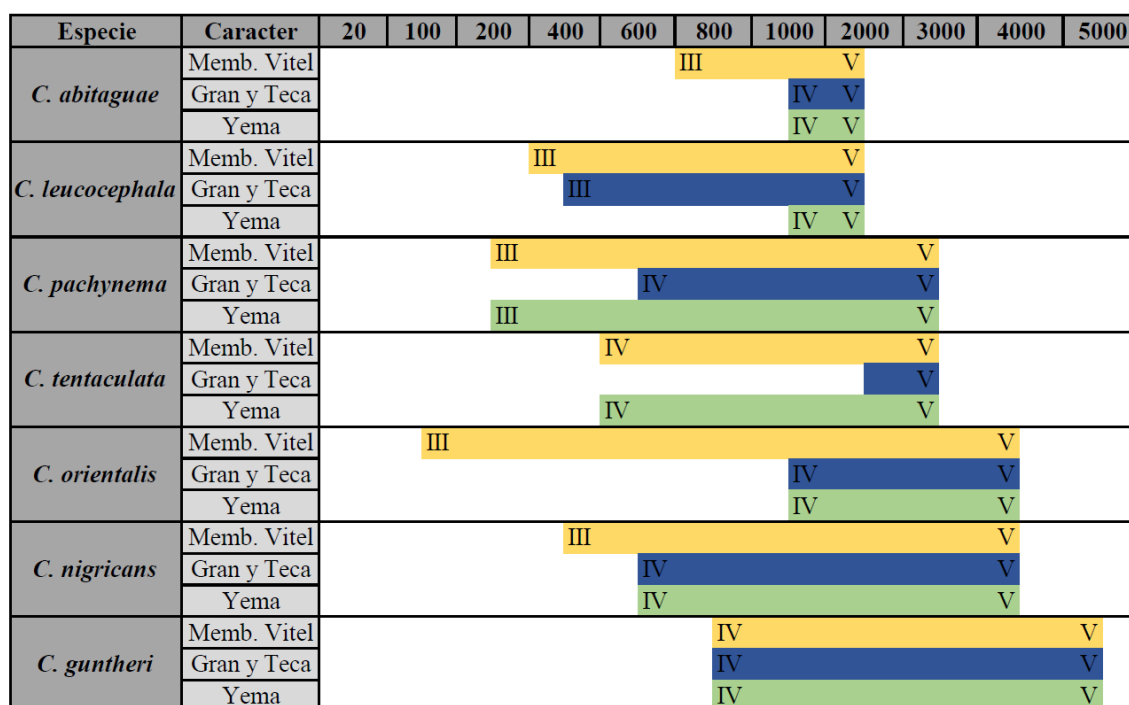


Fig. 9 Características foliculares en las siete especies de cecílicos organizados por tamaño final del oocito. Se consideran 3 características: 1) Aparecimiento de la membrana vitelina 2) Diferenciación de las membranas granulosa y teca 3) Formación de plaquetas de yema. La relación que presentan estas características entre sí demuestran modularidad dentro de la vitelogénesis. En *C. abitaguae*, *C. nigricans*, *C. orientalis* y *C. leucocephala* la membrana vitelina aparece antes que se formen las primeras plaquetas de yema, incluso siendo evidente desde el estadio III, es decir previtelogénicos. Sólo en *C. guntheri* los tres procesos son sincronizados y en el resto de especies la aparición de plaquetas de yema y la formación de la granulosa y la teca son después. En *C. orientalis* y *C. leucocephala* el tiempo que transcurre entre la aparición de la membrana vitelina y los otros dos procesos es muy amplio. La mayoría de especies coinciden en un rango de 1000 a 2000 μm y que coinciden los tres procesos, excluyendo a *C. tentaculata* puesto que la teca y la granulosa se diferencian recién a partir de las 2000 μm . Se observa gran heterocronía de estos procesos entre las siete especies analizadas.

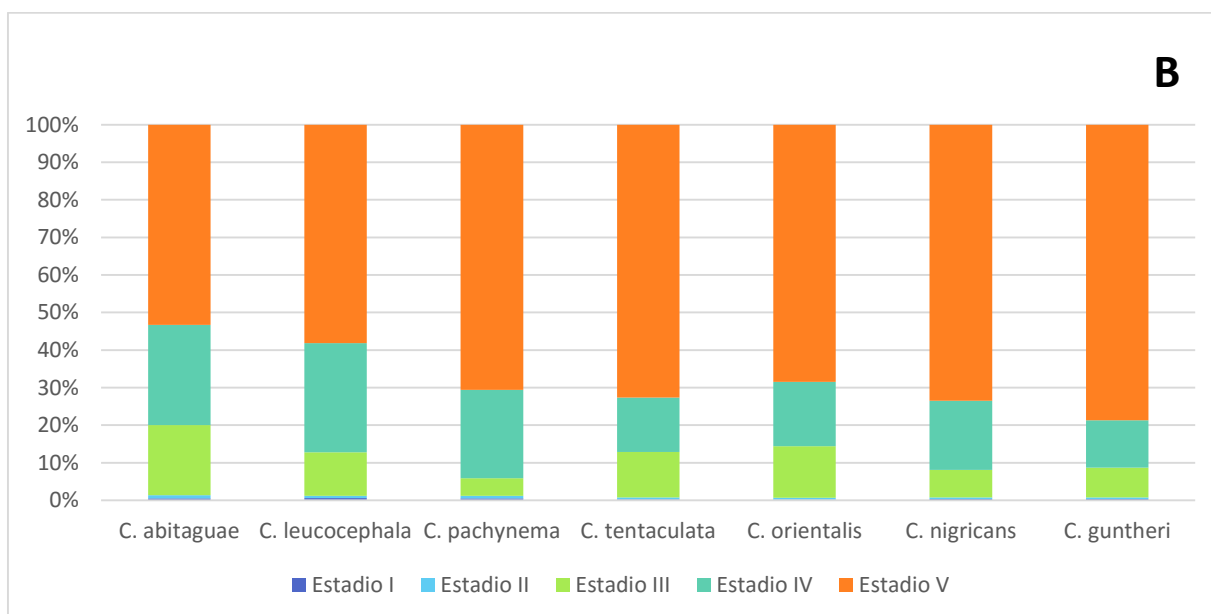
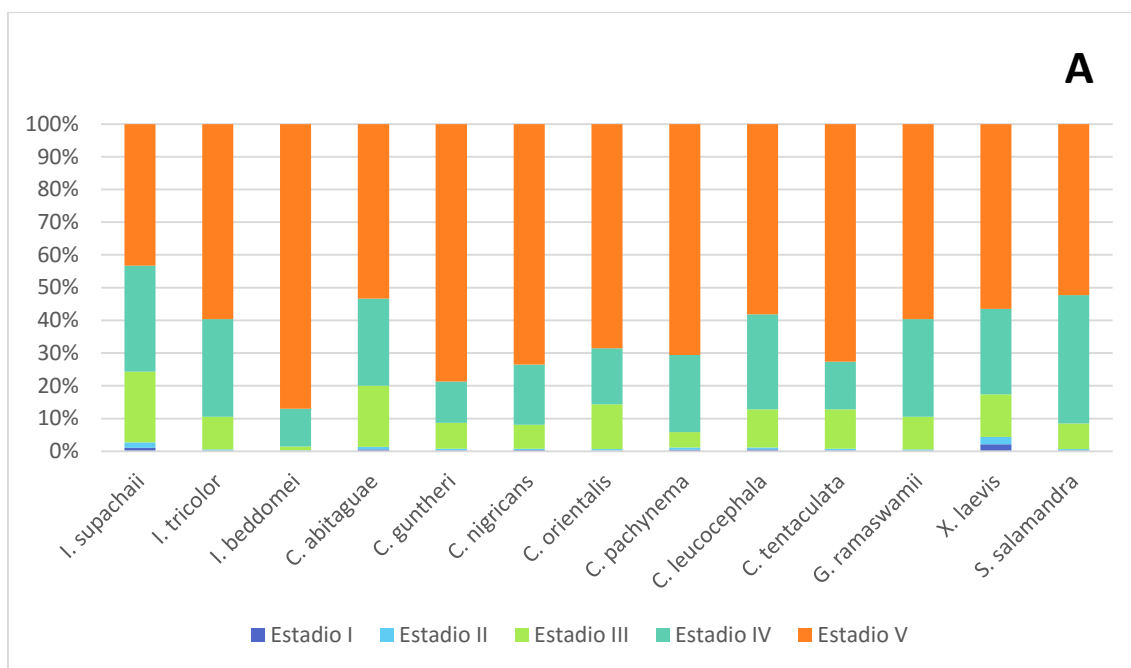


Fig. 10 Diferencias en porcentaje del tamaño de cada estadio de la oogénesis. **A)** Las especies se encuentran en orden filogenético, estando a la izquierda los más basales y a la derecha los más derivados. Al final se encuentran *X. laevis* y *S. salamandra* como grupos externos **B)** Los porcentajes de *Caecilia* ordenados dependiendo del tamaño máximo de los oocitos completamente crecidos. A la izquierda el menor y a la derecha el mayor.

Se representa por medio de porcentajes el tiempo que invierte cada especie en cada estadio. Se observa que los dos primeros estadios representan menos del 5% del total del tiempo en todas las especies. El estadio V en la mayoría representa más del 50% del tiempo. Este tiempo no está asociado a las relaciones filogenéticas del orden. Se observa la heterocronía de la oogénesis dentro del orden.

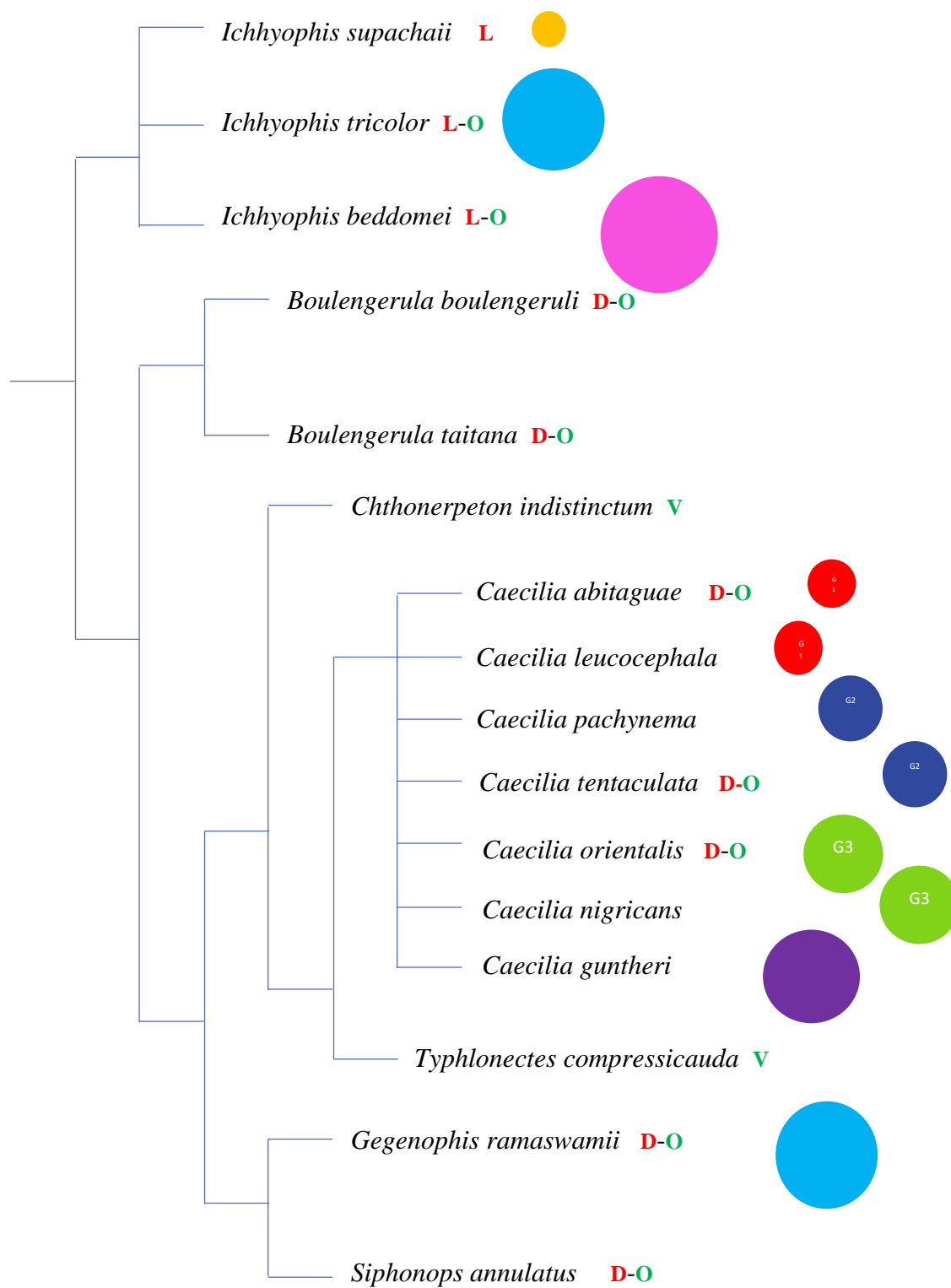


Fig. 11 Orden filogenético de cecílicos cuya oogénesis es conocida. Frente a cada especie se anota el tipo de estrategia reproductiva que presenta. En la mayoría de especies es desconocida la estrategia reproductiva. Los círculos (800 μm -naranja, 2000 μm -rojo, 3000 μm -azul, 4000 μm -verde, 5000 μm -morado, 6000 μm -celeste, 7500 μm -rosado) representan el tamaño máximo del oocito completamente crecido de cada especie. La condición ancestral es el oviparismo con estadio larval. D-Desarrolladores Directos; L-Bifásicos, poseen un estadio larval; O-Ovíparos; V-vivíparos.

9. TABLAS

Tabla 1.- Valores de diámetro máximos y mínimos de oocitos por especie. En negrillas se muestran los folículos de mayor y menor tamaño para todas las especies analizadas.

Especie	Oogonio más pequeño (µm)	Oocito más grande (µm)	Número de oocitos (n=124)
<i>C. abitaguae</i>	16,8	1692,55	15
<i>C. leucocephala</i>	19,49	2222,88	9
<i>C. nigricans</i>	16,85	4068,06	11
<i>C. pachynema</i>	16,06	3483,03	21
<i>C. orientalis</i>	11,43	3738,99	29
<i>C. guntheri</i>	15,52	4989,41	27
<i>C. tentaculata</i>	12,23	3419,78	12

Tabla 2.- Medias de oocitos y núcleos por especie, por estadio

Especie	Estadio 1				Estadio 2				Estadio 3				Estadio 4				Estadio 5			
	Diámetro (µm)		Diámetro oocito (µm)		Diámetro núcleo (µm)		Diámetro oocito (µm)		Diámetro núcleo (µm)		Diámetro oocito (µm)		Diámetro núcleo (µm)		Diámetro oocito (µm)		Diámetro núcleo (µm)			
	Rango	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar			
C. abitaguae	(0-20)	22	4,47	10	0	571,42	75,59	91,41	15,73	1000	0	100	0	1666,66	577,35	0	0			
C. guntheri	(0-20)	21,81	4,04	10	0	244,44	142,40	62,22	18,55	800*	0*	20	0	3600	1140,17	0	0			
C. leucocephala	(0-20)	20	0	10	0	266,66	152,75	63,33	20,81	1000	0	0	0	1500	707,10	0	0			
C. nigricans	(0-20)	20	0	13,33	2,88	366,66	57,73	76,66	5,77	800	282,84	100	0	2666,66	1154,70	0	0			
C. orientalis	(0-10)	18,33	5,68	10	0	42,85	250,71	78,57	30,78	1000	0	100	0	3500	707,10	0	0			
C. pachynema	(0-20)	23,3	5,16	10	0	168,57	53,98	35,71	12,72	550	369,68	72,5	32,01	1825	1372,04	0	0			
C. tentaculata	(0-10)	12,5	5	10	0	400	141,42	85	21,21	600	0	100	0	2800	447,21	0	0			

Tabla 3.- Tamaño de estadios por especie.

	C. abitaguae	C. guntheri	C. nigricans	C. orientalis	C. pachynema	C. leucocephala	C. tentaculata
Estadio 1	<20 µm	< 20 µm	< 20 µm	< 10 µm	< 20 µm	< 20 µm	< 10 µm
Estadio 2	20-30 µm	20-30 µm	20 µm	10-30 µm	20-30 µm	20 µm	10-20 µm
Estadio 3	500-700 µm	100-500 µm	300-400 µm	100-800 µm	80-200 µm	100-400 µm	300-500 µm
Estadio 4	1000 µm	800 µm *	600-1000 µm	1000 µm	200-1000 µm	1000 µm	600 µm
Estadio 5	1000 – 2000 µm	2000-5000 µm	2000-4000 µm	3000-4000 µm	400-3000 µm*	1000-2000 µm	2000-3000 µm

Tabla 4.- Tamaño de oocitos de especies previamente descritas

	<i>Ichthyophis supachaii</i>	<i>Ichthyophis tricolor</i>	<i>Ichthyophis beddomei</i>	<i>Gegeneophis ramaswamii</i>
Estadio 1	0-20 μm	0-10 μm	0-10 μm	0-10 μm
Estadio 2	20-30 μm	40-50 μm	10 μm	40-50 μm
Estadio 3	200-400 μm	50-1000 μm	40-100 μm	50-1000 μm
Estadio 4	600 μm	1000-3000 μm	200-1000 μm	1000-3000 μm
Estadio 5	800 μm	3000-6000 μm	1000-7500 μm	3000-6000 μm

10. ANEXO

Anexo 1.- Lista de especímenes de museo utilizados. Los códigos marcados con (*) fueron ingresados al museo luego de tomar las muestras.

Espece	Museo	Códigos
<i>C. abitaguae</i>	QCAZ	QCAZA57766 *
<i>C. orientalis</i>	QCAZ	QCAZA58101 *
<i>C. orientalis</i>	QCAZ	QCAZA6987
<i>C. orientalis</i>	QCAZ	QCAZA21417
<i>C. orientalis</i>	QCAZ	QCAZA12856
<i>C. pachynema</i>	QCAZ	QCAZA1962
<i>C. pachynema</i>	QCAZ	QCAZA1973
<i>C. guntheri</i>	QCAZ	QCAZA1989
<i>C. guntheri</i>	QCAZ	QCAZA1984
<i>C. guntheri</i>	QCAZ	QCAZA6988
<i>C. tentaculata</i>	MZUTI	MZUTI3919 *
<i>C. leucocephala</i>	MECN	MECN1524
<i>C. leucocephala</i>	MECN	MECN6691
<i>C. leucocephala</i>	MECN	MECN6692
<i>C. leucocephala</i>	MECN	MECN7993
<i>C. nigricans</i>	MECN	MECN1525
<i>C. nigricans</i>	MECN	MECN6695
<i>C. nigricans</i>	MECN	MECN6696

Anexo 2.- Tamaños de oocito más grande y de Longitud total del adulto.

(Fletcher, 2002; Arteaga, 2015; Amphibiaweb, 2016;

AmphibiaWebEcuador, 2016)

Especie	Oocito más grande (µm)	Longitud Rostro-cloacal del adulto (mm)
<i>C. abitaguae</i>	2000	1550
<i>C. leucocephala</i>	2000	438
<i>C. nigricans</i>	4000	1440
<i>C. pachynema</i>	3000	944
<i>C. orientalis</i>	4000	210
<i>C. guntheri</i>	5000	1602
<i>C. tentaculata</i>	3000	987

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Francesca Nicole Angiolani Larrea, con CC. 1718388380, autora del trabajo de graduación titulado: “Descripción de la oogénesis en siete especies de cecílicos del Ecuador.”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 01 de julio del 2016

f)

CC# 1718388380